

英語版 January 2011 に対応

# QIAamp<sup>®</sup> Circulating Nucleic Acid プロトコールとトラブルシューティング

ヒト血漿、血清、尿、その他の無細胞体液からの  
循環 DNA / RNA / miRNA / ウイルス核酸の  
濃縮と精製

# 目次

## プロトコール

血清あるいは血漿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離核酸精製	3
血清あるいは血漿 4 ml / 5 ml からの遊離核酸精製	7
尿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離核酸精製	11
尿 4 ml からの遊離核酸精製	15
血清、血漿、尿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離 microRNA 精製	19
トラブルシューティング	22

## プロトコール：血清あるいは血漿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離核酸精製

これは 1 ml、2 ml、3 ml の血清あるいは血漿から遊離 DNA および RNA を精製するためのプロトコールです。4 ml あるいは 5 ml の検体の場合は、7 ページ “プロトコール：血清あるいは血漿 4 ml / 5 ml からの遊離核酸精製” をご覧ください。尿検体からの遊離 DNA および RNA の精製に関しては、“プロトコール：尿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離核酸精製” (11 ページ)、あるいは “プロトコール：尿 4 ml からの遊離核酸精製” (15 ページ) をご覧ください。遊離 RNA および miRNA の精製に関しては、“プロトコール：血清、血漿あるいは尿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離 microRNA 精製” (19 ページ) をご覧ください。

### 実験を始める前の重要事項

- テキスト中、1 ml の血清あるいは血漿を使用する場合は■、2 ml の血清あるいは血漿を使用する場合は▲、3 ml の血清あるいは血漿を使用する場合は●で記載しています。
- 全ての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。
- 吸引操作中に一定の吸引力を確保するために、各プロトコールステップの間は必ず吸引ポンプのスイッチを切ってください。

### 実験開始前の準備事項

- 検体を室温（15～25℃）に戻します。
- 検体量が■ <1 ml、▲ <2 ml、● <3 ml の場合は、PBS (phosphate-buffered saline) で■ 1 ml、▲ 2 ml、● 3 ml に調整します。
- QIAvac 24 Plus のセットアップに関しては英語版 Handbook 18～21 ページを参照してください。
- ステップ 4 で 50 ml の遠心チューブを加熱するために、ウォーターバスあるいはヒートブロックを 60℃ に加熱します。
- ステップ 14 で 2 ml のコレクションチューブを加熱するために、ヒートブロックを 56℃ に加熱します。
- ステップ 15 で使用する溶出用 Buffer AVE を室温に戻します。
- Buffer ACB、Buffer ACW1、Buffer ACW2 を英語版 Handbook 14 ページの説明に従って調製したことを確認してください。
- 英語版 Handbook 14～15 ページおよび表 2 に従って、Buffer AVE で溶解調製したキャリア RNA を Buffer ACL に添加します。

表 2. ■ 1 ml、▲ 2 ml、● 3 ml の検体調製に必要な Buffer ACL とキャリア RNA (Buffer AVE で溶解) の量

検体数	Buffer ACL (ml)			Buffer AVE で溶解した キャリア RNA (μl)
	■	▲	●	
1	0.9	1.8	2.6	5.6
2	1.8	3.5	5.3	11.3
3	2.6	5.3	7.9	16.9
4	3.5	7.0	10.6	22.5
5	4.4	8.8	13.2	28.1
6	5.3	10.6	15.8	33.8
7	6.2	12.3	18.5	39.4
8	7.0	14.1	21.1	45.0
9	7.9	15.8	23.8	50.6
10	8.8	17.6	26.4	56.3
11	9.7	19.4	29.0	61.9
12	10.6	21.1	31.7	67.5
13	11.4	22.9	34.3	73.1
14	12.3	24.6	37.0	78.8
15	13.2	26.4	39.6	84.4
16	14.1	28.2	42.2	90.0
17	15.0	29.9	44.9	95.6
18	15.8	31.7	47.5	101.3
19	16.7	33.4	50.2	106.9
20	17.6	35.2	52.8	112.5
21	18.5	37.0	55.4	118.1
22	19.4	38.7	58.1	123.8
23	20.2	40.5	60.7	129.4
24	21.1	42.2	63.4	135.0

## 操作手順

1. 50 ml 遠心チューブ（別途準備）に■ 100  $\mu$ l、▲ 200  $\mu$ l、● 300  $\mu$ l の QIAGEN Proteinase K をピペットで入れる。
2. この 50 ml チューブに血清あるいは血漿を■ 1 ml、▲ 2 ml、● 3 ml 入れる。
3. ■ 0.8 ml、▲ 1.6 ml、● 2.4 ml の Buffer ACL (1.0  $\mu$ g のキャリア RNA を含む) を入れる。蓋を閉めて、パルスボルテックスで 30 秒間混和する。

チューブ内で混和による渦輪が発生していることを確認してください。効率的な溶解を行なうためには、検体と Buffer ACL 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。

注：この時点で操作を中断しないでください。すぐにステップ 4 に進み、溶解インキュベーションを開始します。

4. 60°C で 30 分間インキュベートする。
5. チューブを実験台に戻し、蓋を開く。
6. ■ 1.8 ml、▲ 3.6 ml、● 5.4 ml の Buffer ACB をチューブ中のライセートに入れる。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. チューブ中のライセートと Buffer ACB の混和液を氷上で 5 分間インキュベートする。
8. QIAvac 24 Plus 上の VacConnector に QIAamp Mini Column を差し込む。20 ml の Tube Extender を QIAamp Mini Column にセットする。

検体の漏れを回避するために、Tube Extender を QIAamp Mini Column にしっかりと挿入してください。

注：カラムの入っていたコレクションチューブは、ステップ 13 での乾燥のための遠心操作で使用します。

9. ステップ 7 のライセート・Buffer ACB 混合液を、QIAamp Mini Column 上の Tube Extender に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から完全に流出した後、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。

ライセート量が多い場合（スタート検体が 3 ml でライセート量が約 11 ml）、吸引により検体が QIAamp Mini メンブレンを通過するまで最高 10 分間必要なことがあります。吸引力の調節が簡便に行なえる Vacuum Regulator (QIAvac Connecting System の一部) をご利用ください。

注：クロスコンタミを回避するために、廃棄する Tube Extender が隣接する QIAamp Mini Column の上を通過しないように注意します。

10. 600  $\mu$ l の Buffer ACW1 を QIAamp 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 ACW1 が QIAamp Mini Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。

11. 750  $\mu$ l の Buffer ACW2 を QIAamp 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 ACW2 が QIAamp Mini Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。
12. 750  $\mu$ l のエタノール (96 ~ 100%) を QIAamp 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。すべてのエタノールがスピニングカラムから流出した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。
13. QIAamp Mini Column の蓋を閉める。これを吸引マニホールドから取り外し、VacConnector を廃棄する。QIAamp Mini Column を新しい 2 ml コレクションチューブに移し (ステップ 8 から)、最高速度 (20,000  $\times$  g ; 14,000 rpm) で 3 分間遠心操作する。
14. QIAamp 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 10 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。
15. QIAamp Mini Column を新しい 1.5 ml 溶出用チューブ (付属品) に移し、ステップ 14 の 2 ml コレクションチューブは廃棄する。20 ~ 150  $\mu$ l の Buffer AVE を QIAamp 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 (15 ~ 25°C) で 3 分間インキュベートする。

**重要：** 溶出用 Buffer AVE を室温 (15 ~ 25°C) に戻したことを確認してください。少量 (50  $\mu$ 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、カラムに結合した核酸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、QIAamp Mini Column にアプライした溶出用バッファー量よりも最大で 5  $\mu$ l 少なくなります。

16. マイクロ遠心機で最高速度 (20,000  $\times$  g ; 14,000 rpm)、1 分間遠心操作し、核酸を溶出する。

## プロトコール：血清あるいは血漿 4 ml / 5 ml からの遊離核酸精製

これは 4 ml あるいは 5 ml の血清あるいは血漿から遊離 DNA および RNA を精製するためのプロトコールです。1 ml、2 ml、3 ml の検体の場合は、3 ページの“プロトコール：血清あるいは血漿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離核酸精製”をご覧ください。尿検体からの遊離 DNA および RNA の精製に関しては、“プロトコール：尿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離核酸精製” (11 ページ)、あるいは“プロトコール：尿 4 ml からの遊離核酸精製” (15 ページ) をご覧ください。遊離 RNA (miRNA を含む) の精製に関しては、“プロトコール：血清、血漿あるいは尿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離 microRNA 精製” (19 ページ) をご覧ください。

### 実験を始める前の重要事項

- テキスト中、4 ml の血清あるいは血漿を使用する場合は▲、5 ml の血清あるいは血漿を使用する場合は●で記載しています。
- 全ての遠心操作は室温 (15 ~ 25℃) で行ないます。
- 吸引操作中に一定の吸引力を確保するために、各プロトコールステップの間は必ず吸引ポンプのスイッチを切ってください。

### 実験開始前の準備事項

- 検体を室温 (15 ~ 25℃) に戻します。
- 検体量が▲ <4 ml、● <5 ml の場合は、PBS (phosphate-buffered saline) で▲ 4 ml、● 5 ml に調整します。
- QIAvac 24 Plus のセットアップに関しては英語版 Handbook 18 ~ 21 ページを参照してください。
- ステップ 4 で 50 ml の遠心チューブを加熱するために、ウォーターバスあるいはヒートブロックを 60℃ に加熱します。
- ステップ 14 で 2 ml のコレクションチューブを加熱するために、ヒートブロックを 56℃ に加熱します。
- ステップ 15 で使用する溶出用 Buffer AVE を室温に戻します。
- Buffer ACB、Buffer ACW1、Buffer ACW2 を英語版 Handbook 14 ページの説明に従って調製したことを確認してください。
- 英語版 Handbook 14 ~ 15 ページおよび表 3 に従って Buffer AVE で溶解調製したキャリア RNA を Buffer ACL に添加します。

表 3. ▲ 4 ml および● 5 ml の検体調製に必要な Buffer ACL とキャリア RNA (Buffer AVE で溶解) の量

検体数	Buffer ACL (ml)		Buffer AVE で溶解した キャリア RNA (μl)
	▲	●	
1	3.5	4.4	5.6
2	7.0	8.8	11.3
3	10.6	13.2	16.9
4	14.1	17.6	22.5
5	17.6	22.0	28.1
6	21.1	26.4	33.8
7	24.6	30.8	39.4
8	28.2	35.2	45.0
9	31.7	39.6	50.6
10	35.2	44.0	56.3
11	38.7	48.4	61.9
12	42.2	52.8	67.5
13	45.8	57.2	73.1
14	49.3	61.6	78.8
15	52.8	66.0	84.4
16	56.3	70.4	90.0
17	59.8	74.8	95.6
18	63.4	79.2	101.3
19	66.9	83.6	106.9
20	70.4	88.0	112.5
21	73.9	92.4	118.1
22	77.4	96.8	123.8
23	81.0	101.2	129.4
24	84.5	105.6	135.0

## 操作手順

1. 50 ml 遠心チューブ(別途準備)に▲ 400  $\mu$ l、● 500  $\mu$ l の QIAGEN Proteinase K をピペットで入れる。
2. このチューブに▲ 4 ml、● 5 ml の血清あるいは血漿を入れる。
3. ▲ 3.2 ml、● 4.0 ml の Buffer ACL (1.0  $\mu$ g のキャリア RNA を含む) を入れる。蓋を閉めて、パルスボルテックスで 30 秒間混和する。

チューブ内で混和による渦輪が発生していることを確認してください。溶解を効率的に行なうためには、検体と Buffer ACL が完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。

注:この時点で操作を中断しないでください。すぐにステップ 4 に進み、溶解インキュベーションを開始します。

4. 60°C で 30 分間インキュベートする。
5. チューブを実験台に戻し、蓋を開く。
6. チューブ中のライセートに▲ 7.2 ml、● 9 ml の Buffer ACB を入れる。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. チューブ中のライセートと Buffer ACB の混和液を氷上で 5 分間インキュベートする。
8. QIAvac 24 Plus 上の VacConnector に QIAamp Mini Column を差し込む。20 ml の Tube Extender を QIAamp Mini Column にセットする。

検体の漏れを回避するために、Tube Extender を QIAamp Mini Column にしっかりと挿入してください。

注: カラムの入っていたコレクションチューブは、ステップ 13 での乾燥のための遠心操作で使用します。

9. ステップ 7 のライセート・Buffer ACB 混合液を QIAamp Mini Column の Tube Extender に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から流出した後、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。

ライセート量が多い場合 (スタート検体が 5 ml でライセート量が約 20 ml)、吸引により検体が QIAamp Mini メンブレンを通過するまで最高 15 分間必要です。吸引力の調節が簡便に行なえる Vacuum Regulator (QIAvac Connecting System の一部) をご利用ください。

注: クロスコンタミを回避するために、廃棄する Tube Extender が隣接する QIAamp Mini Column の上を通過しないように注意します。

10. 600  $\mu$ l の Buffer ACW1 を QIAamp 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。全ての Buffer ACW1 が QIAamp Mini Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。

11. 750  $\mu$ l の Buffer ACW2 を QIAamp 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 ACW2 が QIAamp Mini Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。
12. 750  $\mu$ l のエタノール (96 ~ 100%) を QIAamp 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。すべてのエタノールがスピニングカラムから流出した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。
13. QIAamp Mini Column の蓋を閉める。これを吸引マニホールドから取り外し、VacConnector を廃棄する。QIAamp Mini Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (ステップ 8 から) に移し、最高速度 (20,000  $\times$  g ; 14,000 rpm) で 3 分間遠心操作する。
14. QIAamp 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 10 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。
15. QIAamp Mini Column を新しい 1.5 ml 溶出用チューブ (付属品) に移し、ステップ 14 の 2 ml コレクションチューブは廃棄する。20 ~ 150  $\mu$ l の Buffer AVE を QIAamp 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 (15 ~ 25°C) で 3 分間インキュベートする。

**重要：** 溶出用 Buffer AVE を室温 (15 ~ 25°C) に戻したことを確認してください。少量 (50  $\mu$ 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、カラムに結合した核酸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、QIAamp Mini Column にアプライした溶出用バッファー量よりも最大で 5  $\mu$ l 少なくなります。

16. マイクロ遠心機で最高速度 (20,000  $\times$  g ; 14,000 rpm)、1 分間遠心操作し、核酸を溶出する。

## プロトコール：尿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離核酸精製

これは 1 ml、2 ml あるいは 3 ml の尿から遊離 DNA および RNA を精製するためのプロトコールです。尿検体 4 ml からの遊離核酸精製に関しては、“プロトコール：尿 4 ml からの遊離核酸精製”（15 ページ）をご覧ください。“血清あるいは血漿からの遊離核酸の精製”に関しては、“プロトコール：血清あるいは血漿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離核酸精製”（3 ページ）、あるいは“プロトコール：血清あるいは血漿 4 ml / 5 ml からの遊離核酸精製”（7 ページ）をご覧ください。遊離 miRNA の精製に関しては、“プロトコール：血清、血漿あるいは尿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離 microRNA 精製”（19 ページ）をご覧ください。

### 実験を始める前の重要事項

- テキスト中、1 ml の尿を使用する場合は■、2 ml の尿を使用する場合は▲、3 ml の尿を使用する場合は●で記載しています。
- 尿から細胞フリーの核酸を精製するためには、高速（例；16,000 x g）で 10 分間遠心操作し、上清のみを核酸精製に使用することを推奨します。これにより細胞成分や細胞由来核酸を検体から除去します。
- 全ての遠心操作は室温（15 ~ 25℃）で行ないます。
- 吸引操作中に一定の吸引力を確保するために、各プロトコールステップの間は必ず吸引ポンプのスイッチを切ってください。

### 実験開始前の準備事項

- 検体を室温（15 ~ 25℃）に戻します。
- 検体量が■ <1 ml、▲ <2 ml、● <3 ml の場合は、PBS（phosphate-buffered saline）で■ 1 ml、▲ 2 ml、● 3 ml に調整します。
- QIAvac 24 Plus のセットアップに関しては英語版 Handbook 18 ~ 21 ページを参照してください。
- ステップ 4 で 50 ml の遠心チューブを加熱するために、ウォーターバスあるいはヒートブロックを 60℃ に加熱します。
- ステップ 14 で 2 ml のコレクションチューブを加熱するために、ヒートブロックを 56℃ に加熱します。
- ステップ 15 で使用する溶出用 Buffer AVE を室温に戻します。
- Buffer ACB、Buffer ACW1、Buffer ACW2 を英語版 Handbook 14 ページの説明に従って調製したことを確認してください。
- 英語版 Handbook 14 ~ 15 ページおよび表 4 に従って Buffer AVE で溶解調製したキャリア RNA を Buffer ACL に添加します。

表 4. ■ 1 ml、▲ 2 ml、● 3 ml の検体調製に必要な Buffer ACL とキャリア RNA (Buffer AVE で溶解) の量

検体数	Buffer ACL (ml)			Buffer AVE で溶解した キャリア RNA (μl)
	■	▲	●	
1	0.9	1.8	2.6	5.6
2	1.8	3.5	5.3	11.3
3	2.6	5.3	7.9	16.9
4	3.5	7.0	10.6	22.5
5	4.4	8.8	13.2	28.1
6	5.3	10.6	15.8	33.8
7	6.2	12.3	18.5	39.4
8	7.0	14.1	21.1	45.0
9	7.9	15.8	23.8	50.6
10	8.8	17.6	26.4	56.3
11	9.7	19.4	29.0	61.9
12	10.6	21.1	31.7	67.5
13	11.4	22.9	34.3	73.1
14	12.3	24.6	37.0	78.8
15	13.2	26.4	39.6	84.4
16	14.1	28.2	42.2	90.0
17	15.0	29.9	44.9	95.6
18	15.8	31.7	47.5	101.3
19	16.7	33.4	50.2	106.9
20	17.6	35.2	52.8	112.5
21	18.5	37.0	55.4	118.1
22	19.4	38.7	58.1	123.8
23	20.2	40.5	60.7	129.4
24	21.1	42.2	63.4	135.0

## 操作手順

1. 50 ml 遠心チューブ（別途準備）に■ 125  $\mu$ l、▲ 250  $\mu$ l、● 375  $\mu$ l の QIAGEN Proteinase K をピペットで入れる。
2. この 50 ml チューブに尿を■ 1 ml、▲ 2 ml、● 3 ml 入れる。
3. ■ 1 ml、▲ 2 ml、● 3 ml の Buffer ACL（1.0  $\mu$ g のキャリア RNA 含有）と■ 250  $\mu$ l、▲ 500  $\mu$ l、● 750  $\mu$ l の Buffer ATL（別途準備）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：Buffer ATL は最後に溶解ミックスに添加します。チューブ内で混和による渦輪が発生していることを確認してください。効率的な溶解を行なうためには、検体と Buffer ACL と ATL 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。

成分を混和すると沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は溶解インキュベーション中に再度溶解され、核酸の収量には影響しません。

注：この時点で操作を中断しないでください。すぐにステップ 4 に進み、溶解インキュベーションを開始します。

4. 60°C で 30 分間インキュベートする。
5. チューブを実験台に戻し、蓋を開く。
6. ■ 3.6 ml、▲ 5.4 ml、● 7.2 ml の Buffer ACB をライセートに加え、蓋を閉め、パルスボルテックスで 15 ~ 30 秒間完全に混和する。
7. ライセートと Buffer ACB の混和液を氷上で 5 分間インキュベートする。
8. QIAvac 24 Plus 上の VacConnector に QIAamp Mini Column を差し込む。20 ml の Tube Extender を QIAamp Mini Column にセットする。

検体の漏れを回避するために、Tube Extender を QIAamp Mini Column にしっかりと挿入してください。

注：カラムの入っていたコレクションチューブは、ステップ 13 での乾燥のための遠心操作で使用します。

9. ステップ 7 のライセートを QIAamp Mini Column 上の Tube Extender に慎重にアプラインする。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から流出した後、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。

ライセート量が多い場合（スタート検体が 4 ml でライセート量が約 20 ml）、吸引により検体が QIAamp Mini メンブレンを通過するまで最高 15 分間必要です。吸引力の調節が簡便に行なえる Vacuum Regulator（QIAvac Connecting System の一部）をご利用ください。

注：クロスコンタミを回避するために、廃棄する Tube Extender が隣接する QIAamp Mini Column の上を通過しないように注意します。

10. 600  $\mu$ l の Buffer ACW1 を QIAamp 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 ACW1 が QIAamp Mini Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。
11. 750  $\mu$ l の Buffer ACW2 を QIAamp 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 ACW2 が QIAamp Mini Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。
12. 750  $\mu$ l のエタノール (96 ~ 100%) を QIAamp 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。すべてのエタノールが QIAamp Mini Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。
13. QIAamp Mini Column の蓋を閉め、吸引マニホールドから取り除き、VacConnector は捨てる。QIAamp Mini Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (ステップ 8 から) に移し、最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 3 分間遠心操作する。
14. QIAamp Mini Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットし、蓋を開き、56°C で 10 分間インキュベートとしてメンブレンを完全に乾燥する。  
ステップ 4 と同じヒートブロックを使用する際は、温度を 4°C 下げます。
15. QIAamp Mini Column を新しい 1.5 ml 溶出用チューブ (付属品) に移し、ステップ 14 の 2 ml コレクションチューブは廃棄する。20 ~ 150  $\mu$ l の Buffer AVE を QIAamp 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 (15 ~ 25°C) で 3 分間インキュベートする。
16. マイクロ遠心機で最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm)、1 分間遠心操作し、核酸を溶出する。

## プロトコール：尿 4 ml からの遊離核酸精製

これは 4 ml の尿から遊離 DNA および RNA を精製するためのプロトコールです。尿 1 ml、2 ml、3 ml からの遊離核酸精製は、“プロトコール：尿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離核酸精製” (11 ページ) をご覧ください。血清あるいは血漿からの遊離核酸の精製に関しては、“プロトコール：血清あるいは血漿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離核酸精製” (3 ページ)、あるいは “プロトコール：血清あるいは血漿 4 ml / 5 ml からの遊離核酸精製” (7 ページ) をご覧ください。遊離 miRNA の精製に関しては、“プロトコール：血清、血漿あるいは尿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離 microRNA 精製” (19 ページ) をご覧ください。

### 実験を始める前の重要事項

- 尿から細胞フリーの核酸を精製するためには、高速（例；16,000 x g）で 10 分間遠心操作し、上清のみを核酸精製に使用することを推奨します。これにより細胞成分や細胞由来核酸を検体から除去します。
- 全ての遠心操作は室温（15 ~ 25℃）で行ないます。
- 吸引操作中に一定の吸引力を確保するために、各プロトコールステップの間は必ず吸引ポンプのスイッチを切ってください。

### 実験開始前の準備事項

- 検体を室温（15 ~ 25℃）に戻します。
- QIAvac 24 Plus のセットアップに関しては英語版 Handbook 18 ~ 21 ページを参照してください。
- ステップ 4 で 50 ml の遠心チューブを加熱するために、ウォーターバスあるいはヒートブロックを 60℃ に加熱します。
- ステップ 14 で 2 ml のコレクションチューブを加熱するために、ヒートブロックを 56℃ に加熱します。
- ステップ 15 で使用する溶出用 Buffer AVE を室温に戻します。
- Buffer ACB、Buffer ACW1、Buffer ACW2 を英語版 Handbook 14 ページの説明に従って調製したことを確認してください。
- 英語版 Handbook 14 ~ 15 ページおよび表 5 に従って Buffer AVE で溶解調製したキャリア RNA を Buffer ACL に添加します。

表 5. 4 ml の検体調製に必要な Buffer ACL とキャリア RNA (Buffer AVE で溶解) の量

検体数	Buffer ACL (ml)	Buffer AVE で溶解した キャリア RNA (µl)
1	4.4	5.6
2	8.8	11.3
3	13.2	16.9
4	17.6	22.5
5	22.0	28.1
6	26.4	33.8
7	30.8	39.4
8	35.2	45.0
9	39.6	50.6
10	44.0	56.3
11	48.4	61.9
12	52.8	67.5
13	57.2	73.1
14	61.6	78.8
15	66.0	84.4
16	70.4	90.0
17	74.8	95.6
18	79.2	101.3
19	83.6	106.9
20	88.0	112.5
21	92.4	118.1
22	96.8	123.8
23	101.2	129.4
24	105.6	135.0

## 操作手順

1. 50 ml 遠心チューブ（別途準備）に 500  $\mu$ l の QIAGEN Proteinase K をピペットで入れる。
2. この 50 ml チューブに尿を 4 ml 入れる。
3. 4 ml の Buffer ACL（必要に応じてキャリア RNA を添加）と 1.0 ml の Buffer ATL 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：Buffer ATL は最後に溶解ミックスに添加します。チューブ内で混和による渦輪が発生していることを確認してください。効率的な溶解を行なうためには、検体と Buffer ACL と ATL 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。

成分を混和すると沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は溶解インキュベーション中に再度溶解され、核酸の収量には影響しません。

注：この時点で操作を中断しないでください。すぐにステップ 4 に進み、溶解インキュベーションを開始します。

4. 60°C で 30 分間インキュベートする。
5. チューブを実験台に戻し、蓋を開く。
6. 9.0 ml の Buffer ACB をライセートに加え、蓋を閉め、パルスボルテックスで 15 ~ 30 秒間完全に混和する。
7. ライセートと Buffer ACB の混和液を氷上で 5 分間インキュベートする。
8. QIAvac 24 Plus 上の VacConnector に QIAamp Mini Column を差し込む。20 ml の Tube Extender を QIAamp Mini Column にセットする。

検体の漏れを回避するために、Tube Extender を QIAamp Mini Column にしっかりと入れてください。

注：カラムの入っていたコレクションチューブは、ステップ 13 での乾燥のための遠心操作で使用します。

9. ステップ 7 のライセートを QIAamp Mini Column の Tube Extender に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から流出した後、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。

ライセート量が多い場合（スタート検体が 4 ml でライセート量が約 20 ml）、吸引により検体が QIAamp Mini メンブレンを通過するまで最高 15 分間必要です。吸引力の調節が簡便に行なえる Vacuum Regulator（QIAvac Connecting System の一部）をご利用ください。

注：クロスコンタミを回避するために、廃棄する Tube Extender が隣接する QIAamp Mini Column の上を通過しないように注意します。

10. 600  $\mu$ l の Buffer ACW1 を QIAamp 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 ACW1 が QIAamp Mini Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。
11. 750  $\mu$ l の Buffer ACW2 を QIAamp 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 ACW2 が QIAamp Mini Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。
12. 750  $\mu$ l のエタノール (96 ~ 100%) を QIAamp 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。すべてのエタノールが QIAamp Mini Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。
13. QIAamp Mini Column の蓋を閉め、吸引マニホールドから取り除き、VacConnector は捨てる。QIAamp Mini Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (ステップ 8 から) に移し、最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 3 分間遠心操作する。
14. QIAamp Mini Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットし、蓋を開き、56°C で 10 分間インキュベートとしてメンブレンを完全に乾燥する。  
ステップ 4 と同じヒートブロックを使用する際は、温度を 4°C 下げます。
15. QIAamp Mini Column を新しい 1.5 ml 溶出用チューブ (付属品) に移し、ステップ 14 の 2 ml コレクションチューブは廃棄する。20 ~ 150  $\mu$ l の Buffer AVE を QIAamp 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 (15 ~ 25°C) で 3 分間インキュベートする。
16. マイクロ遠心機で最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm)、1 分間遠心操作し、核酸を溶出する。

## プロトコール：血清、血漿、尿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離 microRNA 精製

これは 1 ml、2 ml、3 ml の血清、血漿、尿から遊離 miRNA（トータル遊離 RNA を含む）を精製するためのプロトコールです。血清あるいは血漿からの遊離 DNA および RNA の精製に関しては、“プロトコール：血清あるいは血漿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離核酸精製”（3 ページ）、あるいは “プロトコール：血清あるいは血漿 4 ml / 5 ml からの遊離核酸精製”（7 ページ）をご覧ください。尿検体からの遊離 DNA および RNA の精製に関しては、“プロトコール：尿 1 ml / 2 ml / 3 ml からの遊離核酸精製”（11 ページ）、あるいは “プロトコール：尿 4 ml からの遊離核酸精製”（15 ページ）をご覧ください。

### 実験を始める前の重要事項

- テキスト中、1 ml の検体を使用する場合は■、2 ml の検体を使用する場合は▲、3 ml の検体を使用する場合は●で記載しています。
- 血漿、血清、尿から細胞フリーの核酸を精製するためには、検体を高速（例；16,000 x g）で 10 分間遠心操作し、上清のみを核酸精製に使用することを推奨します。これにより細胞成分や細胞由来核酸を検体から除去します。
- 全ての遠心操作は室温（15 ~ 25℃）で行ないます。
- 吸引操作中に一定の吸引力を確保するために、各プロトコールステップの間は必ず吸引ポンプのスイッチを切ってください。

### 実験開始前の準備事項

- 検体を室温（15 ~ 25℃）に戻します。
- 検体量が■ <1 ml、▲ <2 ml、● <3 ml の場合は、PBS（phosphate-buffered saline）で■ 1 ml、▲ 2 ml、● 3 ml に調整します。
- QIAvac 24 Plus のセットアップに関しては英語版 Handbook 18 ~ 21 ページを参照してください。
- ステップ 4 で 50 ml の遠心チューブを加熱するために、ウォーターバスあるいはヒートブロックを 60℃ に加熱します。
- ステップ 14 で 2 ml のコレクションチューブを加熱するために、ヒートブロックを 56℃ に加熱します。
- ステップ 15 で使用する溶出用 Buffer AVE を室温に戻します。
- Buffer ACB、Buffer ACW1、Buffer ACW2 を英語版 Handbook 14 ページの説明に従って調製したことを確認してください。

## 操作手順

1. 50 ml 遠心チューブ（別途準備）に■ 130  $\mu$ l、▲ 270  $\mu$ l、● 400  $\mu$ l の QIAGEN Proteinase K をピペットで入れる。
2. この 50 ml チューブに血漿／血清／尿を■ 1 ml、▲ 2 ml、● 3 ml 入れる。
3. ■ 1.1 ml、▲ 2.1 ml、● 3.2 ml の Buffer ACL（キャリア RNA なし）と■ 0.33 ml、▲ 0.67 ml、● 1.0 ml の Buffer ATL 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：Buffer ATL は最後に溶解ミックスに添加します。チューブ内で混和による渦輪が発生していることを確認してください。効率的な溶解を行なうためには、検体と Buffer ACL と ATL 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. 60°C で 30 分間インキュベートする。
5. チューブを実験台に戻し、蓋を開く。
6. ■ 3.0 ml、▲ 6.0 ml、● 9.0 ml の Buffer ACB と■ 2.3 ml、▲ 4.7 ml、● 7.0 ml のイソプロパノールをライセートに加え、蓋を閉め、パルスボルテックスで 15 ～ 30 秒間完全に混和する。
7. ライセートと Buffer ACB の混和液を氷上で 5 分間インキュベートする。
8. QIAvac 24 Plus 上の VacConnector に QIAamp Mini Column を差し込む。20 ml の Tube Extender を QIAamp Mini Column にセットする。

検体の漏れを回避するために、Tube Extender を QIAamp Mini Column にしっかりと入れてください。

注：カラムの入っていたコレクションチューブは、ステップ 13 での乾燥のための遠心操作で使用します。

9. QIAamp Mini Column の Tube Extender にステップ 7 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から流出した後、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。

ライセート量が多い場合（スタート検体が 3 ml でライセート量が約 23 ml）、吸引により検体が QIAamp Mini メンブレンを通過するまで最高 15 分間必要です。吸引力の調節が簡便に行なえる Vacuum Regulator（QIAvac Connecting System の一部）をご利用ください。

注：クロスコンタミを回避するために、廃棄する Tube Extender が隣接する QIAamp Mini Column の上を通過しないように注意します。

10. 600  $\mu$ l の Buffer ACW1 を QIAamp 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 ACW1 が QIAamp Mini Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。

11. 750  $\mu$ l の Buffer ACW2 を QIAamp 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 ACW2 が QIAamp Mini Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。
12. 750  $\mu$ l のエタノール (96 ~ 100%) を QIAamp 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。すべてのエタノールが QIAamp Mini Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。
13. QIAamp Mini Column の蓋を閉め、吸引マニホールドから取り除き、VacConnector は捨てる。QIAamp Mini Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (ステップ 8 から) に移し、最高速度 (20,000  $\times$  g ; 14,000 rpm) で 3 分間遠心操作する。
14. QIAamp Mini Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットし、蓋を開き、56°C で 10 分間インキュベートとしてメンブレンを完全に乾燥する。  
ステップ 4 と同じヒートブロックを使用する際は、温度を 4°C 下げます。
15. QIAamp Mini Column を新しい 1.5 ml 溶出用チューブ (付属品) に移し、ステップ 14 の 2 ml コレクションチューブは廃棄する。20 ~ 150  $\mu$ l の Buffer AVE を QIAamp 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 (15 ~ 25°C) で 3 分間インキュベートする。
16. マイクロ遠心機で最高速度 (20,000  $\times$  g ; 14,000 rpm)、1 分間遠心操作し、核酸を溶出する。

# トラブルシューティング

## コメント

### 溶出液中に核酸が少ないあるいは全くない

- |  |   |
|--|---|
| 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) 採血後、血漿調製までの時間が長い                              | 血液細胞が分解しゲノム DNA が血漿中に遊離するので、ターゲットとしている遊離核酸が希釈される。   |
| c) 検体の凍結と融解を 2 回以上行なった                           | DNA 分解を引き起こすので、凍結解凍の繰り返しは避ける。常に新鮮な検体あるいは一回のみ解凍した検体を使用する。  |
| d) 検体中の DNA ターゲット濃度が低い                           | 検体を長期間、室温で放置した。新しい検体で精製操作を再度行なう。  |
| e) Buffer ACL 中での検体溶解が効率的でない                     | QIAGEN Proteinase K を長時間・高温度で使用した場合、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 QIAGEN Proteinase K を用いて操作を繰り返す。 |
| f) Buffer ACL とキャリア RNA の混和が不十分                  | Buffer ACL とキャリア RNA の入ったチューブを少なくとも 10 回静かに転倒させて、Buffer ACL とキャリア RNA を混和する。                    |
| g) 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。                         |
| h) Buffer ACB が正しく調製されていない                       | 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（エタノールを使用しない、英語版 Handbook 14 ページ参照）。                      |
| i) Buffer ACW1 あるいは Buffer ACW2 の調製が不正確          | オリジナルの Buffer ACW1 および ACW2 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。     |
| i) Buffer ACW1 あるいは Buffer ACW2 を 70% エタノールで調製した | Buffer ACW1 および ACW2 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。  |

## コメント

---

### DNA あるいは RNA を用いたダウンストリームの酵素反応で良好な実験結果が得られない

- |  |   |
|--|---|
| a) 溶出液中に DNA が少ないか皆無                   | “溶出液中に核酸が少ないあるいは全くない” (22 ページ) の項で原因を調べる。可能なら、反応液に添加する溶出液量を増やす。           |
| b) 使用した溶出液量が適切でない                      | 増幅反応に適した溶出液の最大量を決める。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。溶出用バッファ量を比例して調節する。        |
| c) バッファー類を完全に混和していない                   | 洗浄用 Buffer ACW2 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。各調製前に、バッファーを完全に混和する。 |
| d) 新しい Taq DNA ポリメラーゼあるいは PCR 用試薬を使用した | 酵素を変更した場合、PCR に使用する溶出液量の調整が必要な場合がある。                                      |
| e) キャリア RNA による妨害                      | 溶出液中のキャリア RNA がダウンストリームの酵素反応を妨害する場合は、キャリア RNA の量を抑えるか、使用を控えてみる。           |

## コメント

---

### 一般的な操作

- a) QIAamp Mini Column が目詰まり
- VacValve を閉じて、Tube Extender のライセートが漏れないように Tube Extender/QIAamp Mini Column/VacConnector/VacValve で構成される全ユニットを QIAvac 24 Plus マニホールドから慎重に取り外す。
- QIAamp Mini Column の Tube Extender に残っているライセートを、新しい 50 ml チューブに慎重に移す。
- ユニット（上記参照）から QIAamp 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 分間あるいは検体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 Mini Column と Tube Extender / VacConnector /（オプション）VacValve で構成されるユニットを再度セットする。50 ml チューブに移していたライセートを Tube Extender に入れて、真空ポンプのスイッチを入れ、VacValve を開き、QIAamp Mini Column に通過させる。
- QIAamp Mini Column の目詰まりが続く場合、上の操作を繰り返す。
- 凍結融解を繰り返したことにより、血漿中の寒冷沈降物が生じることがある。これは、QIAamp Mini Column をブロックする。2 回以上凍結・融解を繰り返した血漿は使用しない。寒冷沈降物が観察される場合は、16,000 x g で 5 分間遠心操作することにより検体を清澄化する。
- b) 溶出量が変動
- 検体が異なると最終溶出量に影響することがある。回収される溶出液量は、QIAamp Mini Column にアプライした溶出用バッファー量よりも最大で 5  $\mu$ l 少なくなる。

## コメント

- b) 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 Mini Column を VacConnector に挿入し、カラムの蓋を閉じ、真空装置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 のついた 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、強力な真空ポンプと交換する。

---

Notes

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp® (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 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.com](http://www.qiagen.com)

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