

DNA全血キット L編

QuickGene DNA whole blood kit L (DB-L)



このシートは、全血からゲノムDNAを分離する手順を、キットハンドブック・取扱説明書からダイジェストしたものです。ご使用前には、キットハンドブック・取扱説明書をよく読み、正しくご使用ください。

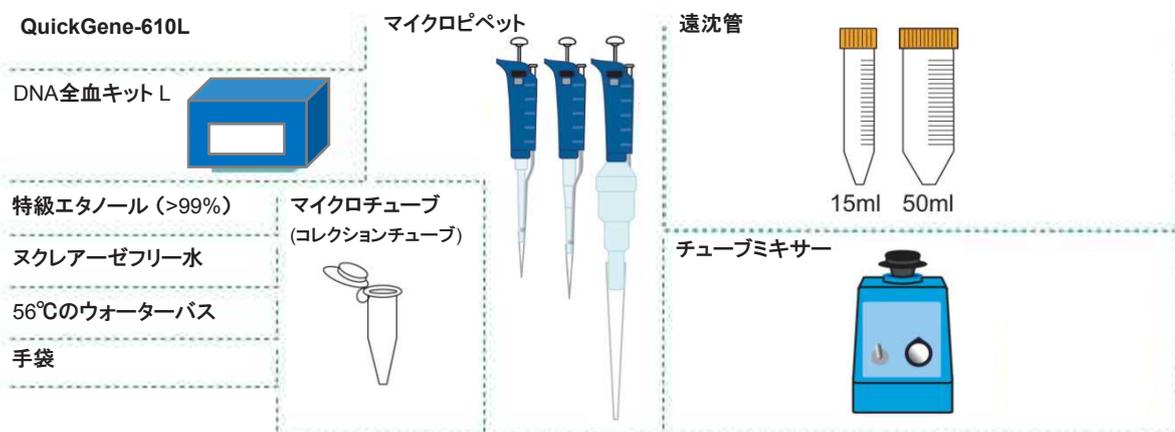


適切な保護手袋、および保護めがねを着用して作業を行ってください。

step1 準備

目的のゲノムDNA分離を行うために、下記のものをご準備ください。

1 準備



2 試薬の準備

◆ 前処理酵素 (EDB)

凍結乾燥品を含む瓶に3.3mlのヌクレアーゼフリーの水を添加し、時々攪拌しながら室温に30分以上置き、完全に溶解させてください。

(溶解後は4°Cで2ヶ月間保存できます。それ以上長期間保存される場合は小分けにして-80°Cで保存してください。)

◆ 溶解液 (LDB)

使用前に十分に混和してください。析出物が生じた場合は、37°Cで溶解してください。

◆ 洗浄液 (WDB)

未開封のWDBボトルに特級エタノール (>99%) を160ml添加・混合してください。

エタノール添加後は、フタをきちんと閉めて室温で保存してください。

◆ 回収液 (CDB)

核酸溶出時には、必ずCDBを使用してください。

続いてstep2プロトコルを行います。

step2 プロトコール

目的の収量を得るため、必ず下記の手順で作業を行ってください。

本キットは、1処理あたり全血2mlに対応しており、標準的なDNA収量は30~80µgです。
回収液量初期値は、500µlです。

全血は、できる限り採血後3日以内、EDTA・2Na、EDTA・2Kまたはヘパリンで採血したものをご使用ください。

1 ウォーターバスを56°Cに設定します。

2 別紙1 洗浄液、回収液の必要量

別紙1を参照し、必要な回収液を遠沈管に注入し、洗浄液のボトルとともにセットします。

3 15ml遠沈管を使用し、1) から 3)の作業を行います。(1)から3)の手順厳守)

1) 溶解済みの前処理酵素 (EDB) 300µlを15ml遠沈管の底に添加します。

2) 全血2mlを添加します。(全血添加後、直ちに3)を行います。)

3) 溶解液 (LDB) 2.5mlを添加し、すぐに上下に10回激しく振とう混和します。

振とう混和を確実にを行い、EDB、全血、LDBが十分に混合するようにします。
次の作業でボルテックスを行います。もし、お持ちのボルテックスの最大回転数が2,500rpm以下の場合は、念入りに振とう混和を行ってください。

4 ボルテックス：15秒 (最大回転数 (2,500rpm以上推奨) で充分混合)

ボルテックスを15秒間最大回転数で行います。
その際、遠沈管のキャップに近いところを持ってください。

混合が充分でないと、目的の収量が得られないことやカートリッジが詰まることがあります。

5 56°Cで5分間インキュベート

インキュベーション時間は、5分間延長までは収量に影響しません。

6 特級エタノール (>99%) を添加後、ボルテックス：15秒 (最大回転数 (2,500rpm以上推奨) で充分混合)

特級エタノール (>99)を2.5ml添加し、遠沈管をすぐに上下に10回激しく振とう混和します。
その後、15秒間最大回転数でボルテックスを行います。

7 ライセート完成

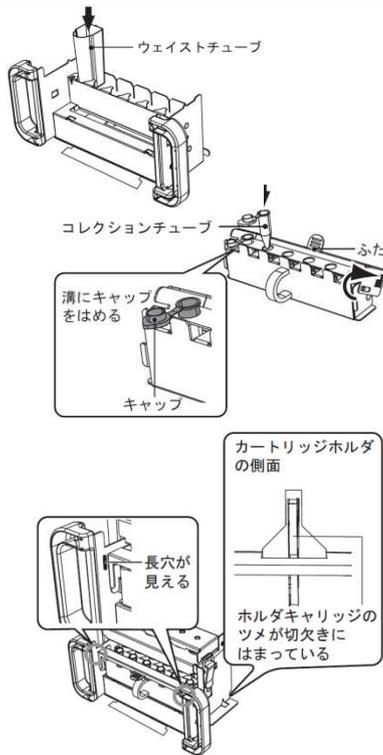
ライセート完成後、30分以内に分離を行ってください。

8 step3 分離 ~ step4 回収と後処理

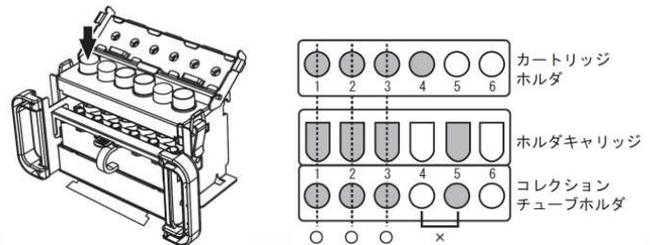
QuickGene-610Lを使って、ゲノムDNAを分離します。

step3 分離

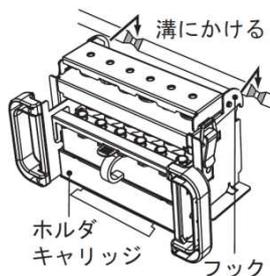
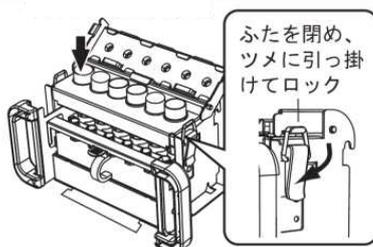
1 消耗品のセット



- 1 ホルダキャリアッジからコレクションチューブホルダとカートリッジホルダを取り外します。
ホルダキャリアッジにウェイストチューブをセットします。
- 2 コレクションチューブホルダのフタを開けて、コレクションチューブをセットします。
- 3 コレクションチューブホルダとカートリッジホルダをホルダキャリアッジにセットします。正しくセットされているか図のように確認します。
- 4 カートリッジホルダに専用カートリッジをセットします。
カートリッジ、ウェイストチューブ、コレクションチューブ3つ全てが同じ番号位置にセットされているか確認します。



2 サンプル分離



- 1 カートリッジにライセートを注入します。
カートリッジホルダのフタを閉めてロックします。
- 2 ホルダキャリアッジを装置にセットします。
フロントカバーを閉じます。
- 3 オペレーションパネルに目的の分離モードが表示されるまで [MODE] ボタンを数回押します。

DNA全血キット L (DB-L)

DNA WHOLE BLOOD

- 4 [START] ボタンを押します。

分離処理中にフロントカバーを開いた場合、装置が一旦停止状態となりますが、分離処理を再開することができます。詳細は、取扱説明書をご参照ください。

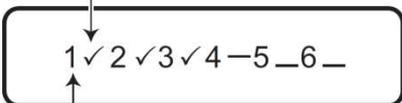
続いてstep4 回収と後処理を行います。

step4 回収と後処理

3 分離結果確認

分離結果の表示例

✓ — _ は、分離結果



数字は、カートリッジの列番号
 ・1～3列目は、正常に分離されました。
 ・4列目は、分離不良でした。
 ・5～6列目は、カートリッジがセットされていませんでした。

- 1 ピピーッと音が鳴れば分離終了です。オペレーションパネルに分離結果が表示されます。

表示	意味
✓ (チェック)	正常終了
— (ハイフン)	分離不良 (カートリッジのつまり)
— (アンダーバー)	カートリッジがセットされていない、または分離前にエラーが発生

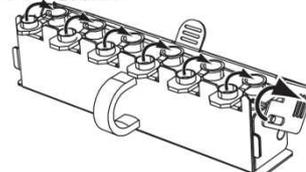
4 サンプル回収

- 1 装置が完全に停止していることを確認した後、フロントカバーを開け、コレクションチューブホルダを取り外します。
- 2 コレクションチューブのキャップを閉めて、取り出します。

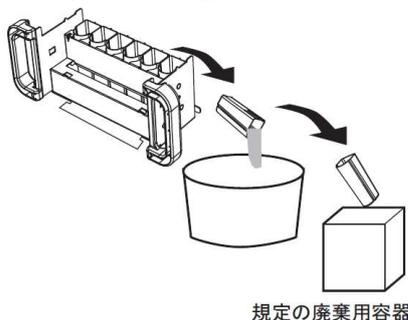
すぐにDNAを使用しない場合は、-20℃で保存します。

回収液量の初期値は、500μlです。

キャップを閉める



5 廃棄・消耗品の処分



- 1 ホルダキャリアッジを取り外します。
- 2 カートリッジホルダを取り外し、カートリッジを処分します。
- 3 ウェイストチューブを取り出し、廃液は規定に従って廃棄し、ウェイストチューブも廃棄してください。



バイオハザード

感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用后廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので、関連する法に従い、焼却、熔融、滅菌、消毒などの処理をしてください。また、委託して行う場合は、特別管理産業廃棄物処分業の免許を持った業者に、特別管理産業廃棄物管理表 (マニフェスト) を添えて処理依頼をしてください。

6 後処理

- 1 ディスチャージトレイを確認します。廃液が溜まっていれば、廃棄します。
 - ・キットを変える場合 ⇒ 別紙2 (キット変更時のディスチャージ)
 - ・終了して1週間以上、装置を使用しない場合 ⇒ 別紙2 (1週間以上使わない場合のディスチャージ)
 - ・続けて作業する場合 ⇒ 下記2以降
- 2 ホルダキャリアッジにカートリッジホルダ、コレクションチューブホルダをセットし、装置に戻します。
- 3 フロントカバーを閉じ、step2からの作業を行います。

7 作業終了