

## DNA全血キット編

### QuickGene DNA whole blood kit S (DB-S)



このシートは、全血からゲノムDNAを抽出する手順を、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抽出を行うために、下記のものをご準備ください。

### 1 準備

QuickGene-810

DNA全血キット

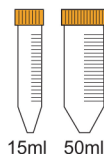


マイクロピペット



遠沈管

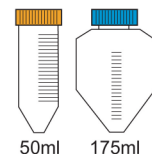
～16サンプルの場合



15ml

50ml

～72サンプルの場合



50ml

175ml

特級エタノール (>99%)

マイクロチューブ



ヌクレアーゼフリー水

56℃のヒートブロック

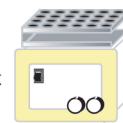
簡易卓上遠心機

手袋

チューブミキサー



または



### 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℃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℃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℃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 プロトコールを行います。

## 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200 $\mu$ lに対応しており、標準的なDNA収量は、4~8 $\mu$ gです。  
回収液量初期値は、200 $\mu$ lです。回収液量は50 $\mu$ lまで下げられますが、その場合、溶出効率が低下する可能性があります。

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 ヒートブロックを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、必要な洗浄液、および回収液を遠沈管に注入し、セットします。

### 3 1.5mlマイクロチューブを使用し、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) 30 $\mu$ lをマイクロチューブの底に添加します。
- 2) 全血200 $\mu$ l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) 250 $\mu$ lを添加し、ピペティング5回 (あるいは転倒混和5回) を行います。

ピペティング (あるいは転倒混和) を確実にし、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、念入りにピペティング (あるいは転倒混和) 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。その後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。

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場合があります。

### 5 56°Cで2分間インキュベート

インキュベーション時間は、5分まで延長しても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250 $\mu$ l添加し、15秒間最大回転数でボルテックスを行った後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。

### 7 ライセート完成

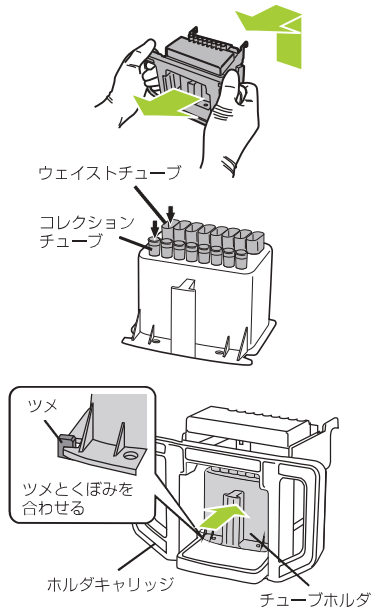
ライセート完成後、30分以内に抽出を行ってください。

### 8 step3 抽出 ~ step4 回収と後処理

QuickGene-810を使って、ゲノムDNAを抽出します。

## step3 抽出

### 1 消耗品のセット (チューブホルダへのセット)

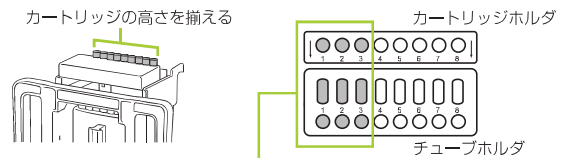


1 フロントカバーを開け、ホルダキャリアッジを取り外します。ホルダキャリアッジからチューブホルダを取り外します。

2 チューブホルダに、ウェイトチューブ、コレクションチューブをセットします。

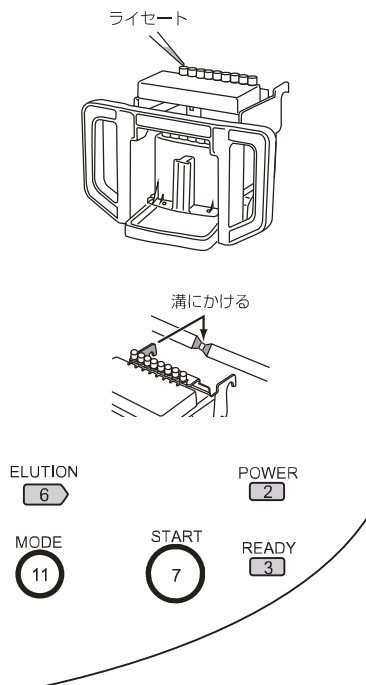
3 チューブホルダをホルダキャリアッジにセットします。

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、ウェイトチューブ、コレクションチューブ3つ全てを同じ番号位置にセットする

### 2 サンプル抽出



1 カートリッジに、ライセートを、マイクロピペットを用いて全量アプライします。

2 ホルダキャリアッジを装置へセットします。

3 オペレーションパネルに目的の抽出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 (DB-S)	DNA WHOLE BLOOD
-----------------	-----------------

4 〔START〕ボタンを押します。

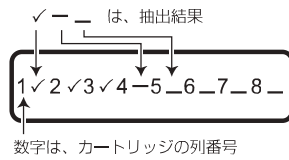
抽出処理中にフロントカバーを開いた場合、装置が一旦停止状態となりますが、抽出処理を再開することができます。詳細は、取扱説明書をご参照ください。

続いてstep4 回収と後処理を行います。

## step4 回収と後処理

### 3 抽出結果確認

#### 抽出結果の表示例



例では、 1～3列目：正常  
4列目：不良  
5～8列目：カートリッジセットなし

- 1 ピピーッと音が鳴れば抽出終了です。オペレーションパネルに抽出結果が表示されます。

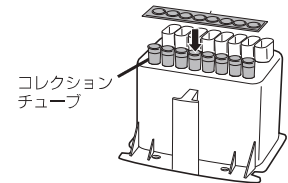
表示	意味
✓ (チェック)	正常終了
- (ハイフン)	抽出不良 (カートリッジのつまり)
- (アンダーバー)	カートリッジがセットされていない、または抽出前にエラーが発生

### 4 サンプル回収

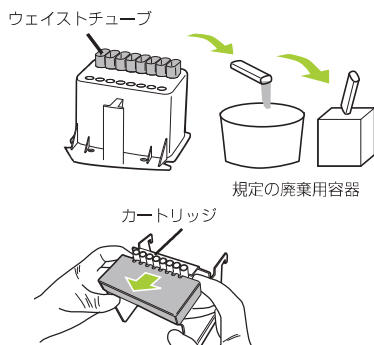
- 1 装置が完全に停止していることを確認した後、フロントカバーを開け、チューブホルダを取り外します。
- 2 コレクションチューブにキャップを付け、取り出し、保存します。

すぐにDNAを使用しない場合は、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存します。

回収液量の初期値は、200 $\mu\text{l}$ です。



### 5 廃棄・消耗品の処分



- 1 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。
- 2 ホルダキャリアッジを取り外します。
- 3 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。

カートリッジホルダの上部をスライドさせ、カートリッジを下に落とし、処分します。



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、溶融、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)
  - ・終了して一週間以上、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、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