

2017 年 2月

QIAasymp[®]phony SP プロトコールシ ー ト

circDNA_2000_DSP_V1および circDNA_4000_DSP_V
1

本文書はQIAasymp[®]phony circDNA_2000_DSP_V1およびcircDNA_4000_DSP_V1プロトコールシート、バージョン1、R1です。

一般的な情報

in vitro診断用

本プロトコールは、QIASymphony SPおよびQIASymphony DSP Circulating DNAキットを用いて、新鮮または凍結ヒト血漿および尿由来のヒト循環セルフリーDNA精製の際に使用します。

| | |
|-----------------|---|
| キット | QIASymphony DSP Circulating DNAキット (カタログ番号 937556) |
| サンプル物質 | ヒト血漿：EDTAまたはクエン酸で抗-凝固、または安定化されたccfDNA ヒト尿：不安定化または安定化 |
| プロトコール名 | circDNA_2000_DSP_V1 circDNA_4000_DSP_V1 |
| デフォルトのアッセイ対照セット | ACS_circDNA_2000_DSP_V1 ACS_circDNA_4000_DSP_V1 |
| 溶出体積 | 60 µl |
| 必要なソフトウェアバージョン | バージョン4.0.3以上 |

“Sample” (サンプル) ドロワー

| | |
|------------|--|
| サンプルの種類 | ヒト血漿 (“Preparation of sample material” 参照) およびヒト尿 (安定化または不安定化) |
| サンプル容積 | 使用したサンプルチューブに依存する 詳しい情報は、 www.qiagen.com の製品ページのリソースタブ下にある実験器具リストを参照してください。 |
| 一次サンプルチューブ | n/a |
| 二次サンプルチューブ | 詳しい情報は、 www.qiagen.com の製品ページのリソースタブ下にある実験器具リストを参照してください。 |
| インサート | n/a |
| その他 | プロテイナーゼKをスロットA (位置1および2、またはその一方) に加えてください。 |

n/a = 該当なし。

“Sample” ドロワー中プロテイナーゼKの準備

QIASymphony DSP Circulating DNAキットはすぐに使用できるプロテイナーゼK溶液を含み、室温で保存できます。

注：プロテイナーゼKが入ったチューブをチューブキャリアに置きます。プロテイナーゼKが入ったチューブを、“Sample” ドロワースロットAのポジション1および2、またはその両方に置いてください。必要なチューブの種類については、 www.qiagen.comの製品ページのリソースタブ下にある実験器具リストを参照してください。

| サンプル数* | circDNA_2000_DSP | circDNA_4000_DSP |
|--------|------------------|------------------------|
| 8 | 1980 µl | 2860 µl |
| 24 | 3740 µl | 6380 µl |
| 48 | 6380 µl | 11.660 ml [†] |
| 96 | 11.660 ml | 22.220 ml [†] |

* 各サンプルについて、circDNA_2000_DSP 110 µlまたは circDNA_4000_DSP 220 µl、さらに追加の空隙容積 1100 µl [(n x 110 または 220 µl) + 1100 µl] が必要です。

[†] circDNA_4000_DSPの場合：48サンプル以上を処理する場合、2本目のチューブを使ってください。チューブ当たり最大ロード容量は11.660 µlです。2本目のチューブについては、1100 µlの追加空隙容積が必要です。

“Reagents and Consumables”（試薬および消耗品）ドロワー

| | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| ポジション A1 および A2、またはその両方 | 試薬カートリッジ |
| ポジションB1 | n/a |
| チップラックホルダー1~18 | ディスポーザブルフィルターチップ、200 µlまたは1500 µl |
| ユニットボックスホルダー1~4 | サンプルプレップカートリッジまたは8ロッドカバーを含むユニットボックス |

n/a = 該当なし。

“Waste”（廃液）ドロワー

| | |
|-----------------|---------------|
| ユニットボックスホルダー1~4 | ユニットボックスを空にする |
| 廃液バッグホルダー | 廃液バッグ |
| 液体廃液ボトルホルダー | 液体廃液ボトルを空にする |

“Eluate”（溶出液）ドロワー

| | |
|----------------------------|---|
| 溶出ラック（スロット1、冷却ポジションの使用を推奨） | 詳しい情報は、 www.qiagen.com の製品ページのリソースタブ下にある実験器具リストを参照してください。 |
|----------------------------|---|

必要なプラスチック容器

circDNA_2000_DSPプロトコール

| プラスチック容器 | 1バッチ 24サンプル* | 2バッチ 48サンプル* | 4バッチ 96サンプル* |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| ディスポーザブルフィル ターチップ、200 μ l ^{†‡} | 24 | 48 | 96 |
| ディスポーザブルフィル ターチップ、1500 μ l ^{†‡} | 64 | 120 | 232 |
| サンプルプレップカート リッジ [§] | 15 | 30 | 60 |
| 8ロッドカバー [¶] | 3 | 6 | 12 |

* バッチ当たり24サンプル以下を使用すると、ランごとに必要なディスポーザブルフィルターチップの数が減少します。。

[†] 32フィルターチップ/フィルターチップラックがあります。

[‡] 必要なフィルターチップの数は試薬カートリッジごとに1インベントリスキャンを行えるフィルターチップです。

[§] 28のサンプルプレップカートリッジ/ユニットボックスがあります。

[¶] 12の8ロッドカバー/ユニットボックスがあります。

プロトコールcircDNA_4000_DSP

| プラスチック容器 | 1バッチ 24サンプル* | 2バッチ 48サンプル* | 4バッチ 96サンプル* |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| ディスポーザブルフィル ターチップ、200 μ l ^{†‡} | 24 | 48 | 96 |
| ディスポーザブルフィル ターチップ、1500 μ l ^{†‡} | 104 | 200 | 392 |
| サンプルプレップカート リッジ [§] | 18 | 36 | 72 |
| 8ロッドカバー [¶] | 3 | 6 | 12 |

* バッチ当たり24サンプル以下を使用すると、ランごとに必要なディスポーザブルフィルターチップの数が減少します。

[†] 32フィルターチップ/フィルターチップラックがあります。

[‡] 必要なフィルターチップの数は試薬カートリッジごとに1インベントリスキャンを行えるフィルターチップです。

[§] 28のサンプルプレップカートリッジ/ユニットボックスがあります。

[¶] 12の8ロッドカバー/ユニットボックスがあります。

注： 任意のフィンガーチップの数は設定によってタッチスクリーンに表示された数と異なることがあります。最大可能数のチップのロードを推奨します。

溶出体積

| 選択した溶出体積 | 初期溶出体積 |
|------------|------------|
| 60 μ l | 75 μ l |

溶出体積はタッチスクリーンで選択します。平均の利用可能溶出体積は ≥ 60 μ lです。個々のケースでは、1サンプルの最終溶出液体積は5 μ lまで、選択体積（例えば55 μ l）以下になります。移動前に溶出液の体積を確認しない自動アッセイセットアップシステムを使用する際には、実際の溶出液体積をチェックすることを推奨します。

溶出液の保管

溶出プレートをラン終了後すぐに“Eluate”ドロワーから取り去ることを推奨します。溶出プレートは一晚のランが終了した後もQIAasympy SPに残ることがあります（ラン時間を含めて最大16時間、推奨環境条件：

18～26° Cおよび相対湿度20～75%）。温度や湿度によって、溶出液が濃縮や蒸発を行うことがあります。

サンプルの準備後、溶出物は1 ヶ月まで2～8 °Cで保存します。長期保存では、溶出物を-20°Cまたは-80°Cで保存します。凍結溶出物は3回以上融解できません。

サンプル物質の準備

化学物質を扱うときは、必ず適切な白衣、使い捨て手袋、保護眼鏡を着用してください。詳しい情報は、製造元が作成した適切な安全データシート(SDS)を参照してください。

開始前の重要ポイント

- サンプル中、サンプル上に泡が形成されないようにしてください。
- サンプルはラン開始前に室温(15～25° C)に戻してください。

ヒト血漿

抗凝固剤としてEDTAまたはクエン酸で処理した血液サンプルは、血漿調製に使用できます。ccf DNAで安定化した採血チューブから調製した血漿も使用できます。血漿は製造者の指示どおりに作成します。

抗凝固剤としてEDTAまたはクエン酸を用いる場合は、血漿分離を献血後直ちに行うことが推奨されます。

下流のアプリケーションの中には、核酸を小胞から除去するか、最小限にする必要がある場合があります。そのような場合は、最初に血漿が発生してから、室温(15-25° C)で高速遠心分離を 16,000 x *g* で10分行います。

採血と遠心分離の後、血漿は室温で7日まで保存でき、2~8°Cで14日まで保存できます。さらに長期保存をする場合は、アリコートの-20°Cまたは-80°Cでの冷凍を推奨します。凍結血漿は 3 回以上融解できません。冷凍融解を繰り返すと、タンパク質の変性および沈降が生じ、循環セルフリー核酸の収量が減少する可能性があります。サンプル中にクリオプレシピテートが目視できる場合、室温(15~25° C)で6,800 x *g* 3 分間 で遠心分離し、沈渣をそのままにして上清を二次サンプルチューブに移します (www.qiagen.comの製品ページのリソースタブ下にある実験器具リストを参照してください)。直ちに精製手順を開始します。

ヒト尿

尿採取後に循環セルフリーDNAが急速に分解するため、尿サンプルを直ちに安定化する事が強く求められます。

安定化されたヒト尿

安定化された尿は室温(15-25° C)または2~8°Cで7 日まで保存できます。さらに長期保存をする場合は、アリコートの-20°Cまたは-80°Cでの冷凍を推奨します。

安定化した尿サンプルはサンプル前処理が必要ありません。安定化後、尿サンプルを室温(15~25° C)下、低速(1900 x *g*)で 10 分遠心分離し、循環セルフリーDNA抽出の前に細胞を除去することを推奨します。遠心分離後に沈渣が上清の中に目視できる場合、サンプルを水浴で25° Cに温めて沈渣を溶解させます。ラン開始前に、安定化した尿サンプルを二次サンプルチューブに移し、このチューブをサンプルキャリアにロードしてください (www.qiagen.comの製品ページのリソースタブ下にある実験器具リストを参照してください)。

ヒト尿 “non-stabilised” (安定化されていない)

Buffer ATLが必要なプロトコール開始前に、沈渣が Buffer ATLに生じているか確認してください。必要ならば、水浴中穏やかに攪拌して70° Cまで加熱し溶解します。Buffer ATLの表面から泡を吸引してください。

注: Buffer ATL(Buffer ATL, 4 x 50 ml, カタログ番号939016)は QIASymphony DSP Circulating DNAキットに含まれておらず、別途注文しなければなりません。

尿サンプルを低速で採取後すぐに室温 (15~25° C)で10 分遠心分離 (1900 x *g*) して細胞を除去することを推奨します。安定化されていない尿サンプルにはサンプル前処理が必要です。

重要：サンプルを前処理開始前に室温(15～25° C)に戻してください。

重要：尿サンプル採取後4時間以内に遠心分離と前処理を行う必要があります。

- 2500 µlの尿(circDNA_2000_DSP)または 4500 µlの尿 (circDNA_4000_DSP) を250 µlまたは 450 µl Buffer ATL とそれぞれ混合します。
- 室温で(15～25° C)サンプルを1時間インキュベートします。
- サンプルを室温 (15～25° C)下、1900 x *g* で10 分遠心分離します。
遠心分離後に沈渣が上清の中に目視できる場合、サンプルを水浴で 25° C に温めて沈渣を溶解させます。
- 上清を二次サンプルチューブに移し、このチューブをサンプルキャリアにロードしてください (www.qiagen.comの製品ページのリソースタブ下にある実験器具リストを参照してください) 。

重要：循環セルフリーDNAの安定性と完全性は、安定化されていない尿に限定されています。QI Asymphonyのランごとに最大1バッチ24サンプルをロードすることが、尿サンプルのオンボード時間を最小限にするため推奨されます。

妨害物質

γ グロブリン濃度が高い(>30 g/l)血漿サンプルは循環セルフリーDNA回収率が低くなることがあります。

最新のライセンス情報および製品固有の免責条項については、各QIAGEN キットハンドブックまたは使用説明書をご覧ください。QIAGEN キットハンドブックおよび使用説明書は www.qiagen.com、QIAGEN テクニカルサービス、お近くの販売業者で入手してください。

登録商標：QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAsymphony® (QIAGEN Group)本文中の登録名称、登録商標等は、特に記号を付していない場合でも、法律で保護されないとは見なされません。
2017/02 HB-2309-S01-001
© 2017 QIAGEN, all rights reserved.

