

QIAsymphony® DSP DNA Mini Kit

機器使用説明書（プロトコールシート）

Tissue_LC_200_V7_DSP and Tissue_HC_200_V7_DSP プロトコール
バージョン 2

IVD

体外診断用医薬品

QIAsymphony DSP DNA Mini Kit（192）と使用



REF

937236



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ドイツ

R1

本プロトコールシートの電子版は、www.qiagen.com の製品ページの
リソースタブ下にあります。

全般情報

QIAsymphony DSP DNA Kit は、体外診断用です。

これらのプロトコールは、QIAsymphony SP と QIAsymphony DSP DNA Mini Kit を使用し、組織およびホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) 組織からトータル DNA を精製するためのものです。

サンプルのタイプに応じて、低含量 (Low Content, LC) プロトコールまたは高含量 (High Content, HC) プロトコールを使用することをお勧めします。高含量プロトコールでの処理は高い DNA 収量を得られます。一方、低含量プロトコールは、少ない溶出量 (50 µl) で高い DNA 濃度を要求される場合に使用します。FFPE 組織には低含量プロトコールを使用することをお勧めします。

低含量プロトコール

キット	QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (カタログ番号 937236)
サンプル材料	FFPE 組織および組織* FFPE 組織は、最大 4 切片、最大厚さ 10 µm、または最大 8 切片、最大厚さ 5 µm、いずれも最大表面積 250 mm ² までを 1 回で調製可能。
プロトコール名	Tissue_LC_200_V7_DSP
デフォルトのアッセイコントロールセット	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
溶出量	50 µl、100 µl、200 µl、または 400 µl
必要なソフトウェアバージョン	バージョン 4.0 以降
体外診断用途に必要なソフトウェア構成	デフォルトプロファイル 1

* 組織サンプルについては高含量プロトコールを参照してください。

高含量プロトコール

キット	QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (カタログ番号 937236)
サンプル材料	組織 予測収量が不明である場合、まずサンプル材料 25 mg で作業することをお勧めします。得られた収量に応じて、その後より大きいサイズのサンプルで調製しても構いません。
プロトコール名	Tissue_HC_200_V7_DSP
デフォルトのアッセイコントロールセット	ACS_TissueHLC_200_V7_DSP
溶出量	50、100、200、または 400 µl
必要なソフトウェアバージョン	バージョン 4.0 以降
体外診断用途に必要なソフトウェア構成	デフォルトプロファイル 1

キット以外に必要な資材

すべてのタイプのサンプル用

- Buffer ATL、4 x 50 ml (カタログ番号 939016)
- RNA 含量を最小限に抑えるため：DNase-free RNase A (ストック溶液 100 mg/ml)

FFPE 組織用 (キシレンを使用しない脱パラフィン処理)

- Deparaffinization Solution (カタログ番号 939018)

FFPE 組織用 (キシレンを使用する脱パラフィン処理)

- キシレン (99~100%)
- エタノール (96~100%) *

「Sample」 (サンプル) ボックス

サンプルのタイプ	FFPE 組織および組織
サンプル量	220 µl (サンプル、プロトコルの要求量) *
処理後のサンプル量	200 µl
一次サンプルチューブ	該当なし
二次サンプルチューブ	詳細は、 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ご覧ください。
インサート	詳細は、 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ご覧ください。

* 高含量プロトコールおよび低含量プロトコールともに、液面高さを検出せずにサンプルを移動させます。システムはサンプルが 220 µl 未満であっても識別しません。したがって、サンプル注入量が 220 µl であることを確認してください。
該当なし = 該当せず。

「Reagents and Consumables」 (試薬および消耗品) ボックス

位置 A1 または A2 (あるいは両方)	試薬カートリッジ (RC)
位置 B1	該当なし
チップラックホルダー1~17	使い捨てフィルターチップ、200 µl または 1500 µl
ユニットボックスホルダー1~4	サンプル調製カートリッジまたは 8-Rod Covers が格納されたユニットボックス

該当なし = 該当せず。

*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。

「Waste」（廃棄物）ボックス

ユニットボックスホルダー1~4	空のユニットボックス
廃棄物バッグホルダー	廃棄物バッグ
廃液ボトルホルダー	空の廃液ボトル

「Eluate（溶出液）」ボックス

溶出ラック（冷却ポジションであるスロット1の使用を推奨）	詳細は、 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ご覧ください。
------------------------------	--

必要なプラスチック製品

プラスチック製品	1つのバッチ、 24 サンプル*	2つのバッチ、 48 サンプル*	3つのバッチ、 72 サンプル*	4つのバッチ、 96 サンプル*
Disposable filter-tips, 200 µl†	26	50	74	98
Disposable filter-tips, 1500 µl†	72	136	200	264
Sample prep cartridges [‡]	21	42	63	84
8-Rod Covers [§]	3	6	9	12

* 各バッチで使用するサンプル数が24より少ない場合は、1回の分析に必要な使い捨てのフィルターチップの数が少なくて済みます。

† 1つのチップラックに32個のフィルターチップが入っています。

‡ 必要なフィルターチップの数には、1つの試薬カートリッジに対して在庫スキャンを1回行うのに必要なフィルターチップが含まれています。

§ 1つのユニットボックスに28個のサンプル調製カートリッジが入っています。

¶ 1つのユニットボックスに12個の8-Rod Coversが入っています。

注：設定によっては、支給されたフィルターチップの数がタッチスクリーンの表示数と異なる場合があります。最大数のチップをロードすることをお勧めします。

溶出量

溶出量はタッチスクリーンで選択します。サンプルのタイプおよびDNA含量により、最終溶出量は選択された溶出量よりも最大15 µl少なくなる可能性があります。溶出量は変動する可能性があることから、自動アッセイセットアップシステムを使用する場合は、移動前に溶出量が検証されないため、実際の溶出量を確認することをお勧めします。溶出量が減少すると最終DNA濃度は上昇しますが、多少収量が低下します。目的のダウンストリームアプリケーションに適した溶出量にすることをお勧めします。

サンプル材料の調製

薬品を取り扱う際には、適切な白衣、使い捨て手袋、保護メガネを必ず着用してください。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 Sheet, SDS）を参照してください。

採取、輸送、および保管に関する一般的な推奨事項は、CLSI 承認ガイドライン MM13-A 「Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods（分子生物学的手法のための検体の採取、輸送、調製、および保管）」を参照してください。

開始する前に

- Buffer ATL に白い沈殿物が生じていないか確認します。必要であれば、時々振りながら 37°C で 30 分間インキュベートし、沈殿物を溶解させます。
- サーマミキサーまたはシェーカーインキュベーターをそれぞれの前処理に必要な温度に設定します。

組織

新鮮および凍結組織を使用して DNA を精製できます。DNA の収量および品質は、組織の種類、ソース、および保存条件によって異なります。新鮮な組織は小片に切断して、処理するまで -20°C または -80°C で保存できます。一般的に、高い DNA 収量が得られる高含量プロトコルの使用をお勧めします。低含量プロトコルは、ダウンストリームアプリケーションで高い DNA 濃度を要求される場合に限り、溶出量 50 μ l で使用することをお勧めします。予測収量が不明である場合、高含量プロトコルを使用してサンプル材料 25 mg、溶出量 200 μ l で手順を開始することをお勧めします。得られた収量に応じて、その後より大きいサイズのサンプル、またはより少ない溶出量で調製しても構いません。少ない溶出量で過剰に調製を行うと、磁性粒子が溶出液にキャリーオーバーされて、DNA 純度と下流分析が損われる可能性があります。

注：凍結組織サンプルを使用する場合、凍結組織サンプルからの自動核酸抽出について ISO 20184-3:2021 (E) に留意してください。

注：サンプル安定性はさまざまな要素に大きく依存し、個々のダウンストリームアプリケーションとも関連性があります。ラボで使用する個々のダウンストリームアプリケーションの使用説明書を参照するか、ワークフロー全体のバリデーション（またはその両方）を実施して、お客様の責任において適切な保存条件を確立してください。

組織前処理プロトコール

1. 組織サンプルを 2 ml マイクロ遠心チューブ（別途必要）に移します。
2. Buffer ATL 220 μ l を加えます。
3. プロテイナーゼ K 20 μ l を加え、チューブを軽くたたいて混和します。

注：QIAsymphony DSP DNA Mini Kit の酵素ラックのプロテイナーゼ K を使用します。

4. チューブをサーモミキサーまたはシェーカーインキュベーターに置き、組織が完全に溶解するまで 900 rpm で振とうしながら 56°C でインキュベートします。

注：溶解時間は処理する組織の種類によって異なります。大半の組織は 3 時間以内に完全に溶解します。3 時間経過後も不溶性物質または高粘度の溶解物が存在するなど完全に溶解していない場合は、溶解時間を延長するか、手順 6 に示すように遠心分離によって不溶性物質を除去することができます。一晩溶解させることも可能です。その場合、調製への影響はありません。

5. 手順 6 に進む前に、サンプル中の RNA 含量を最小限に抑えるために、RNase A (100 mg/ml) 4 μ l を加えて室温 (15~25°C) で 2 分間インキュベートします。
6. 何回かピペット操作を行い、サンプルを均質化します。

注：不溶性物質がまだ存在する場合、3000 x g で 1 分間遠心分離します。

7. 上清 220 μ l を、QIAsymphony SP のサンプルキャリアに対応したサンプルチューブに慎重に移します。
8. 対応するサンプルチューブの全リストは、www.qiagen.com の実験器具リストを参照してください。2 ml チューブ（Sarstedt、カタログ番号 72.693 または 72.608 など）の使用をお勧めします。

FFPE 組織

標準的な FFPE 手順は必ず核酸の著しい断片化を招きます。DNA の断片化を抑えるには、以下を確認してください。

- サンプル組織を切除してからできるだけ早く、4~10%ホルマリンで固定します。
- 固定の時間は 14~24 時間とします（これ以上長い固定は、さらに深刻な DNA の断片化につながり、ダウンストリームアッセイでの分析結果に悪影響が及びます）。
- 包埋の前にサンプルを徹底的に脱水します（残留ホルマリンは、プロテイナーゼ K 消化を阻害する可能性があります）。

DNA 精製の出発物質は切除したての FFPE 組織切片とします。最大 4 切片、最大厚さ 10 μm 、または最大 8 切片、最大厚さ 5 μm 、いずれも最大表面積 250 mm^2 までの組織を 1 回で調製可能です。出発物質の特性が不明である場合、まず 3 切片以下で 1 回の調製を行うことをお勧めします。DNA 収量と純度に応じて、以降の調製で 8 切片まで使用することが可能です。

注：FFPE 組織を使用する場合、サンプル取り扱いの補足情報として、FFPE 組織サンプルからの自動核酸抽出について ISO 20166-3:2018 (E)に留意してください。

注：FFPE 組織プロトコールは、少量の RNA を同時精製する目的に限定して設計されています。したがって、QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit で手動精製する場合と比較して、光度測定値が低くなります。

FFPE 組織前処理プロトコール

メソッド 1：Deparaffinization Solution を使用した脱パラフィン処理

1. 外科用メスを使用し、サンプルのブロックから過剰なパラフィンを切除します。
2. 厚さ 10 μm で最大 4 切片、または厚さ 5 μm で最大 8 切片に分けます。
注：サンプルの表面が空気に暴露されていた場合は、最初の 2~3 切片を廃棄します。
3. すぐに切片を QIASymphony SP のサンプルキャリアに対応した 2 ml Sarstedt チューブ（別途必要、カタログ番号 72.693 または 72.608）に入れます。
4. 切片に Buffer ATL 200 μl を加えます。
5. プロテイナーゼ K 20 μl を加えます。
注：QIASymphony DSP DNA Mini Kit の酵素ラックのプロテイナーゼ K を使用します。
6. Deparaffinization Solution 160 μl または 320 μl （下表を参照）を加え、ボルテックスして混和します。

切片の厚さ	切片数	Deparaffinization Solution 容量
5 μm	1~4	160 μL
	5~8	320 μL
10 μm	1~2	160 μL
	3~4	320 μL

7. チューブを ThermoMixer またはシェーカーインキュベーターに置き、組織が完全に溶解するまで 1000 rpm で振とうしながら 56°C で 1 時間インキュベートします。

注：溶解時間は処理する組織の種類によって異なります。大半の組織は 1 時間以内に完全に溶解します。1 時間経過後も不溶性物質が存在するなど完全に溶解していない場合は、溶解時間を延長するか、手順 10 に示すように遠心分離によって不溶性物質を細かくすることができます。一晚溶解させることも可能です。その場合、調製への影響はありません。

8. 90°C で 1 時間インキュベートします。

注：Buffer ATL で 90°C でインキュベートすると、核酸のホルムアルデヒドによる変性は一部逆行します。これよりも長時間または高温のインキュベーションは、DNA のさらなる断片化につながります。ヒートブロックをひとつのみ使用している場合は、56°C のインキュベーション後、ヒートブロックが 90°C になるまでサンプルを室温に置きます。

9. サンプル中の RNA 含量を最小限に抑えるために、RNase A (100 mg/ml) 2 µl を下層に加え、室温で 2 分間インキュベートしてから手順 10 に進みます。サンプルを室温まで冷ましてから、RNase A を加えます。

10. 室温で 1 分間最高速度で遠心分離します。

11. トランスファーチューブ（両方の層を含む）を QIAsymphony SP のサンプルキャリアに慎重に移します。

メソッド 2：キシレンを使用した脱パラフィン処理

1. 外科用メスを使用し、サンプルのブロックから過剰なパラフィンを切除します。

2. 厚さ 10 µm で最大 4 切片、または厚さ 5 µm で最大 8 切片に分けます。

注：サンプルの表面が空気に暴露されていた場合は、最初の 2~3 切片を廃棄します。

3. すぐに切片を 1.5 ml または 2 ml マイクロ遠心チューブ（別途必要）に入れて、キシレン 1 ml をサンプルに加えます。蓋を閉じて 10 秒間激しくボルテックスします。

4. 室温で 2 分間最高速度で遠心分離します。

5. ピペット操作により上清を除去します。ペレットを除去しないでください。

6. エタノール 1 ml (96~100%) をペレットに加え、ボルテックスして混和します。

注：エタノールがサンプルから残留キシレンを抽出します。

7. 室温で 2 分間最高速度で遠心分離します。

8. ピペット操作により上清を除去します。ペレットを除去しないでください。

注：細いピペットチップを使用して、残留エタノールを慎重に除去します。

9. チューブの蓋を開け、10 分間または残留エタノールがすべて蒸発するまで室温 (15~25°C) でインキュベートします。

注：インキュベーションは、37°C までの温度で行うことができます。

10. Buffer ATL 220 µl にペレットを再懸濁させます。

11. プロテイナーゼ K 20 µl を加え、ボルテックスして混和します。

注：QIAsymphony DSP DNA Mini Kit の酵素ラックのプロテイナーゼ K を使用します。

12. 56°C で 1 時間（またはサンプルが完全に溶解するまで）インキュベートします。

注：溶解時間は処理する組織の種類によって異なります。大半の組織は 1 時間以内に完全に溶解します。1 時間経過後も不溶性物質が存在するなど完全に溶解していない場合は、溶解時間を延長するか、手順 16 に示すように遠心分離によって不溶性物質を除去することができます。一晚溶解させることも可能です。その場合、調製への影響はありません。

13. 90°C で 1 時間インキュベートします。

注： Buffer ATL で 90°C でインキュベートすると、核酸のホルムアルデヒドによる変性は一部逆行します。これよりも長時間または高温のインキュベーションは、DNA のさらなる断片化につながります。ヒートブロックをひとつのみ使用している場合は、56°C のインキュベーション後、ヒートブロックが 90°C になるまでサンプルを室温に置きます。

14. サンプルを軽く遠心分離し、蓋の内側の水滴を除去します。
15. サンプル中の RNA 含量を最小限に抑えるために、RNase A (100 mg/ml) 2 µl を加え、室温で 2 分間インキュベートしてから手順 16 に進みます。サンプルを室温まで冷ましてから、RNase A を加えます。
16. 溶解物 220 µl を、QIAsymphony SP のサンプルキャリアに対応したサンプルチューブに慎重に移します。

注： 溶解物に未消化物質が含まれる場合は、室温で 2 分間最高速度で遠心分離して、上清をサンプルチューブに移します。対応するサンプルチューブの全リストは、www.qiagen.com の実験器具リストを参照してください。2 ml チューブ (Sarstedt、カタログ番号 72.693 または 72.608 など) の使用をお勧めします。

溶出液の保管

分析が終了したらすぐに、「Eluate」 (溶出液) ボックスから溶出プレートを取り外すことをお勧めします。分析の完了に一晩かかると (分析時間を含めて最長 12 時間、推奨環境条件：温度 18~26°C、相対湿度 20~75%)、溶出プレートが QIAsymphony SP に残る場合があります。温度と湿度によっては、溶出により結露や蒸着が発生することがあります。

短期保存の場合、室温で最長 2 週間の保存が可能です。長期間保存する場合、2~8°C、-20°C、または -80°C での保存をお勧めします。

注： 溶出液の安定性はさまざまな要素に大きく依存し、個々のダウンストリームアプリケーションとも関連性があります。QIAsymphony DSP DNA Mini Kit は、一般的なダウンストリームアプリケーションと組み合わせた検証を実施済みですが、ラボで使用する個々のダウンストリームアプリケーションの使用説明書を参照するか、ワークフロー全体のバリデーション (またはその両方) を実施して、お客様の責任において適切な保存条件を確立してください。

開始する前の重要な留意点

- QIAsymphony の磁性粒子はサンプルに含まれる RNA と DNA を同時に精製します。RNA を含まない DNA が必要な場合、個々の前処理プロトコールで指示されるステップで RNase A をサンプルに加えます。

制限事項および妨害物質

QIAsymphony DSP DNA Mini Kit の開発において、サンプル調製に悪影響を及ぼす妨害物質は同定されませんでした。

注： 一般的なダウンストリームアプリケーションを使用した試験により、抽出された核酸の品質評価を実施済みです。ただし、ダウンストリームアプリケーションによって要求される純度 (潜在的な妨害物質の有無) が異なる可能性があることから、ダウンストリームアプリケーションにおいて QIAsymphony DSP DNA Mini Kit を使用するワークフローを開発する場合は、該当する物質の同定および試験を実施する必要があります。

図記号

本書では次の図記号を使用しています。本使用説明書、パッケージ、およびラベルに使用されるすべての図記号については、ハンドブックをご覧ください。

図記号	図記号の定義
	この製品は、体外診断用医療機器規則(EU)2017/746 に準拠しています。
	体外診断用医療機器
	カタログ番号
Rn	R は使用説明書の改訂を示し、n は改訂番号を示す。
	製造者

改訂履歴

改訂	説明
R1、2022年6月	バージョン 2、改訂 1 <ul style="list-style-type: none">体外診断用医療機器規則への適合に伴い、バージョン 2 に更新「制限事項および妨害物質」のセクションを追加「溶出液の保管」のセクションを追加「図記号」のセクションを追加「サンプル材料の調製」のセクションを更新

ライセンスに関する最新情報や製品に固有の免責事項については、該当する QIAGEN®キットの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 Kit ハンドブックとユーザーマニュアルは、弊社ウェブサイト (www.qiagen.com) から入手できます。QIAGEN テクニカルサービスや最寄りの販売代理店からも入手可能です。

商標：QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); BD™ (Becton Dickinson and Company); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). 本文書で使用されている登録済みの名称、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はありません。

06/2022 HB-3029-S07-001© 2022 QIAGEN、無断複写・転載を禁じます。