

2022 年 6 月

# QIAamp<sup>®</sup> DSP Circulating NA Kit 使用説明書 (ハンドブック)



バージョン 2

**IVD**

体外診断用医薬品

**CE**

**REF**

61504



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

R1 **MAT**

1127632JA

# 目次

使用目的 .....	4
対象使用者 .....	4
説明と原理 .....	5
サンプル量 .....	5
サンプルの溶解 .....	7
QIAamp Mini カラム膜への吸着 .....	7
残存汚染物質の除去 .....	7
純粋な核酸の溶出 .....	8
核酸の収量とサイズ .....	8
プロトコールの説明 .....	9
概要と説明 .....	9
キットに含まれる材料 .....	10
キットの内容 .....	10
キットのコンポーネント .....	11
キット以外に必要な資材 .....	12
その他の試薬 .....	12
消耗品 .....	12
器具 .....	13
警告と注意 .....	14
安全情報 .....	14
緊急時の情報 .....	15
注意事項 .....	15

<b>廃棄</b> .....	16
試薬の保管と取り扱い .....	17
<b>使用中の安定性</b> .....	17
標本の保管と取り扱い .....	18
操作手順 .....	19
バッファーと試薬の調製 .....	26
Breeze プロトコール：1～5 mL のヒト血漿から循環核酸を精製 .....	29
クラシックプロトコール：1～5 mL のヒト血漿からの循環核酸の精製 .....	34
品質管理 .....	39
制限事項 .....	39
性能特性 .....	40
参照 .....	41
トラブルシューティングガイド .....	42
図記号 .....	46
付録 A：血漿の分離と保管に関する勧告 .....	49
付録 B: RNA 取り扱いの一般的注意事項 .....	51
注文情報 .....	52
文書の改訂履歴 .....	53

## 使用目的

QIAamp DSP Circulating NA Kit は、シリカ膜技術（QIAamp テクノロジー）を使ってヒト血漿サンプルから循環無細胞 DNA および RNA を手動で分離、精製するシステムです。

QIAamp DSP Circulating NA Kit は、体外診断用です。

## 対象使用者

この製品は、分子生物学技術について訓練を受けた技師や医師をはじめとするプロフェッショナルな使用者向けの製品です。

## 説明と原理

QIAamp DSP Circulating NA の操作手順は 4 ステップ（溶解、結合、洗浄、溶出）で構成されており、QIAvac システムの QIAamp Mini カラムを使用して行います。この頑健な手法は、感染の可能性があるサンプルを取り扱う際、サンプル間のクロスコンタミネーションを最小限に抑制し、ユーザーの安全性を高めるのに有用です。

このシンプルな手法では、最大 24 サンプルを 2 時間以内に同時処理することができます。

## サンプル量

QIAamp Mini カラムは、20 nt という短い断片化核酸を結合することができますが、収量はサンプル量やサンプル中の循環核酸濃度に応じます（一般に 1~100 ng/mL 血漿）。QIAamp DSP Circulating NA の操作手順は、最大 5 mL までのサンプル量に最適化されています。

QIAamp DSP Circulating  
NA Kit の操作手順

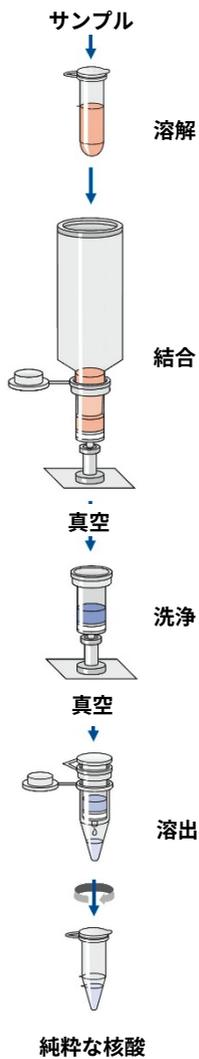


図 1. QIAamp DSP Circulation NA Kit の操作手順の概要。

## サンプルの溶解

体液中の遊離循環核酸は通常タンパク質に結合するかベシクルに包まれているため、核酸を放出し QIAamp Mini カラムに選択的に結合させるための効率的な溶解ステップが必要になります。そのため、サンプルを、プロテイナーゼ K と Buffer ACL の存在下で高温の高変性条件下で溶解します。これによって DNase と RNase が不活性化し、結合したタンパク質、脂質、ベシクルから核酸が放出されます。

## QIAamp Mini カラム膜への吸着

循環核酸の膜への結合を最適化するため、溶解物に Buffer ACB を加えて結合条件を調整します。次に、溶解物を QIAamp Mini カラムに移します。溶解物が真空圧で吸引されるにつれて、大量の溶解物から循環核酸がシリカ膜に吸着します。PCR などのダウンストリーム酵素反応を阻害する可能性があるタンパク質などの汚染物質の大半は、塩と pH 条件により、QIAamp Mini カラム膜に保持されません。

プロトコールには、真空マニホールド (QIAvac Connecting System を備えた QIAvac 24 Plus など) と約 800~900 mbar の真空を作り出せる真空ポンプ (QIAGEN® Vacuum Pump など) が必要です。Vacuum Regulator (QIAvac Connecting System の一部) を使用して、真空圧を容易に監視し真空リリースを間便に行う必要があります。

## 残存汚染物質の除去

核酸は膜に結合したままですが、汚染物質は 3 回の洗浄ステップで効率的に洗い流されます。

## 純粋な核酸の溶出

溶出は Buffer AVE を使用して行われます。単一ステップで、高純度の循環核酸が、室温に平衡化した Buffer AVE に溶出します。50~150  $\mu\text{L}$  の柔軟な溶出量に対応しています。高濃度の核酸が必要な場合は、溶出量を 20  $\mu\text{L}$  まで下げることができます。溶出量が 50  $\mu\text{L}$  未満の場合、核酸溶出液の濃度は高くなりますが、総収量が低下する可能性があります。

回収される溶出液量は、カラムに適用される溶出バッファの量よりも最大 5  $\mu\text{L}$  少なくなります。

## 核酸の収量とサイズ

生体サンプルから分離した遊離循環核酸の収量は通常 1  $\mu\text{g}$  未満であるため、分光光度計での測定は困難です。QIAamp DSP Circulating NA Kit を使用してサンプルから得られる循環 DNA と RNA の絶対収量は、回収した個人のサンプルによって異なるほか、他の要因（特定の疾患状態など）にも依存します。また、抽出した核酸中に存在する担体 RNA は、UV 吸光度の読み取りに影響を与える可能性があります（27 ページ参照）。収量の判定には定量的増幅法が推奨されます。

QIAamp DSP Circulating NA Kit を使用して精製した循環核酸のサイズ分布は、アガロースゲル電気泳動やターゲット特異的標識プローブ (1) へのハイブリダイゼーション、またはマイクロフルイディック電気泳動溶液 (Agilent® Bioanalyzer など) によって確認できます。

## プロトコールの説明

本ハンドブックでは 2 種類のプロトコールについて説明します。

- 「Breeze プロトコール：1～5 mL のヒト血漿から循環核酸を精製」（29 ページ）は、最大 5 mL の血漿を 1 mL 単位で処理するプロトコールで、実施時間と所要時間の短縮に向けて最適化されています。
- 「クラシックプロトコール：1～5 mL のヒト血漿からの循環核酸の精製」（34 ページ）は、最大 5 mL の血漿を 1 mL 単位で処理するプロトコールで、QIAamp DSP Circulating NA Kit ハンドブックバージョン 1、改訂第 3 版（R3）のプロトコールと同じです。

## 概要と説明

遊離循環核酸は通常、<1000 bp (DNA)、<1000 nt (RNA)、または 20 nt (miRNA) という短いフラグメントでヒト血漿中に存在します。一般にヒト血漿中の遊離循環核酸濃度は低く、またヒトサンプル中に 1～100 ng/mL と大きな個体差があります (2-6)。

QIAamp DSP Circulating NA Kit は、ヒト血漿の循環核酸を効率よく精製できます。新鮮なサンプルでも凍結サンプルでも使用可能です。エクステンションチューブと QIAvac 24 Plus での真空処理により、開始サンプル量は最大 5 mL まで可能で、溶出量が 20～150  $\mu$ L と柔軟であるため、低濃度の核酸種の濃縮が可能です。

溶出した遊離循環ゲノム DNA や RNA は、そのままダウンストリームアプリケーションへの使用や保存が可能です。実験室で特定のターゲットやダウンストリームアプリケーション用に血漿のインプットや溶出体積を最適化する必要があります。

# キットに含まれる材料

## キットの内容

QIAamp DSP Circulating NA Kit	(50)
カタログ番号	61504
プレップ数	50

	品目	図記号	数量
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tube (WT) (2 mL) (洗浄チューブ (WT) (2 mL) を備えた QIAamp Mini カラム)	COL	50
EXT	Column Extenders (カラムエクステンダー) (20 mL)	COL EXT	2 x 25
WT	Wash Tube (洗浄チューブ) (2 mL)	WASH TUBE	50
ET	Elution Tube (溶出チューブ) (1.5 mL)	ELU TUBE	50
VC	VacConnector	VAC CON	50
ACL*	Lysis Buffer (溶解バッファー) *	LYS BUF	220 mL
ACB*	Binding Buffer (結合バッファー) * (濃縮)	BIND BUF CONC	300 mL
ACW1*	Wash Buffer 1 (洗浄バッファー 1) * (濃縮)	WASH BUF 1 CONC	19 mL
ACW2†	Wash Buffer 2 (洗浄バッファー 2) † (濃縮)	WASH BUF 2 CONC	13 mL
AVE†	Elution Buffer (溶出バッファー) † (紫色のキャップ)	ELU BUF	5 x 2 mL
PROTK	QIAGEN Proteinase K (QIAGEN プロテイナーゼ K)	PROTK	4 x 7 mL
Carrier	Carrier RNA (担体 RNA) (赤色のキャップ)	CAR RNA	310 µg
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tube (WT) (2 mL) (洗浄チューブ (WT) (2 mL) を備えた QIAamp Mini カラム)	COL	50
	ハンドブック	HB	1

\* カオトロピック塩が含まれます。警告と注意については、14 ページを参照してください。

† 保存料としてアジ化ナトリウムを含む。

## キットのコンポーネント

キットの主要なコンポーネントを以下に説明します。

表 1.同梱の試薬中の活性成分

試薬		活性成分	濃度
図記号	名前		
ACL	Lysis Buffer (溶解バッファー)	チオンアン酸グアニジン	≥30~<50% w/w
ACB	Binding Buffer (結合バッファー) (濃縮)	チオンアン酸グアニジン	≥30~<50% w/w
ACW1	Wash Buffer 1 (洗浄バッファー1) (濃縮)	塩酸グアニジン	≥30~<60% w/w
ACW2	Wash Buffer 2 (洗浄バッファー2) (濃縮)	なし	-
AVE	Elution Buffer (溶出バッファー) (紫色のキャップ)	なし	-
PROTK	QIAGEN Proteinase K (QIAGEN プロテイナーゼ K)	プロテイナーゼ K	≥1~<3% w/w
Carrier	Carrier RNA (担体 RNA) (赤色のキャップ)	なし	-

## コントロールとキャリブレーター

核酸分離後に生成される診断結果に悪影響が及ぶあらゆるリスクを最小限に抑えるため、ダウンストリームプロセスを適切に管理する必要があります。

# キット以外に必要な資材

## その他の試薬

- エタノール (96~100%) \*
- イソプロパノール (100%)
- 破碎氷片 (「クラシックプロトコール：1~5 mL のヒト血漿からの循環核酸の精製」のみ)
- 一部のサンプルはリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-Buffered Saline, PBS) で希釈する必要があります。

## 消耗品

- ピペット (調節可能)
- 滅菌ピペットチップ (クロスコンタミネーションを防ぐため、エアロゾルバリア付きピペットチップが推奨されます)
- 1.5 mL または 2 mL ヌクレアーゼフリーマイクロチューブ
- 50 mL 遠心管

\* 変性アルコールは使用しないでください。これは、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です。

## 器具

- 56°C または 60°C で 50 mL 遠心管を保持できる水槽またはヒートブロック \*
- 2 mL の洗浄チューブを保持できる 56°C のヒートブロックまたは類似物（クラッシュクプロトコールのみ）\*
- ボルテックスミキサー
- マイクロ遠心機（2 mL チューブ用ロータ付き）\*
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold（カタログ番号 19413）
- QIAvac Connecting System（カタログ番号 19419）または同等品
- Vacuum Pump（カタログ番号 84010 [米国、カナダ]、84000 [日本]、84020 [その他]）または-800 mbar~-900 mbar の真空を作り出せる同等のポンプ
- オプション：VacValves（カタログ番号 19408）

\* 機器が製造者の推奨通りに点検され、校正されていることを確認してください。

## 警告と注意

デバイスに関連して発生した重大なインシデントを、製造者およびユーザーや患者を規定する規制当局に報告する場合は、地域の規制を参照する必要がある場合があることにご注意ください。

体外診断用医薬品

## 安全情報

薬品を取り扱う際には、必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを使用してください。詳細は、適切な安全データシート(Safety Data Sheets, SDS)を参照してください。これらは、各 QIAGEN キットおよびキットコンポーネントの SDS を検索、表示、印刷可能な [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) から、便利でコンパクトな PDF 形式でオンラインにて入手できます。

警告

人身傷害の危険



サンプル調製廃棄物に直接漂白剤や酸性の溶液を混ぜないでください。

Buffer ACL、Buffer ACB、Buffer ACW1 にはグアニジン塩が含まれており、漂白剤と混ぜると高反応性化合物が生じる可能性があります。

このようなバッファーを含む液がこぼれた場合は、適切な実験室用洗剤と水で洗浄してください。こぼれた液に感染病原体が含まれる可能性がある場合は、まず汚染された部分を実験室用洗剤と水で洗浄し、その後次亜塩素酸ナトリウムの 1% (v/v) 水溶液で洗浄してください。

- 検体とサンプルは潜在的に感染力があります。サンプルとアッセイの廃棄物は、地域の安全手順に従って廃棄してください。

## 緊急時の情報

CHEMTREC

米国、カナダ 1-800-424-9300

米国・カナダ以外 +1 703-527-3887

## 注意事項

次のハザードおよび警告の表示は、QIAamp DSP Circulating NA Kit のコンポーネントに適用されます。

### Buffer ACB



含有物質: チオシアン酸グアニジン危険飲み込むと有害。皮膚に接触したり吸入すると有害のおそれ。重篤な皮膚の薬傷・眼の損傷。長期継続的影響により水生生物に有害。酸と接触すると非常に有毒なガスが発生。防護用手袋、防護服、目、顔面の防護具を使用します。目に入った場合: 注意して水で数分間洗い流してください。コンタクトレンズを装着しており、はずすことが困難でなければ、コンタクトレンズをはずし、洗眼を続けます。即時に毒物センターに電話するか、医師の診察を受けてください。

### Buffer ACL



含有物質: チオシアン酸グアニジン危険飲み込むと有害。皮膚に接触したり吸入すると有害のおそれ。重篤な皮膚の薬傷・眼の損傷。長期継続的影響により水生生物に有害。酸と接触すると非常に有毒なガスが発生。防護用手袋、防護服、目、顔面の防護具を使用します。目に入った場合: 注意して水で数分間洗い流してください。コンタクトレンズを装着しており、はずすことが困難でなければ、コンタクトレンズをはずし、洗眼を続けます。即時に毒物センターに電話するか、医師の診察を受けてください。

### Buffer ACW1



含有物質: 塩酸グアニジン警告飲み込んだり吸入すると有害。皮膚の刺激の原因となります。重大な目刺激の原因となります。防護用手袋、防護服、目、顔面の防護具を使用します。汚染された衣服を脱ぎ、再度使用する前に洗浄します。内容物、容器は承認された廃棄物処理装置または廃棄物処理工場へ廃棄してください。

## Proteinase K



含有物質: プロテイナーゼ K 危険。皮膚への軽い刺激の原因となります。吸入した場合、アレルギーやぜんそくの症状をもたらす、呼吸の困難につながります。粉塵、煙、ガス、ミスト、蒸気、噴霧を吸入しないこと。防護用手袋、防護服、目、顔面の防護具を使用します。呼吸用保護具を着用します。曝露または曝露の懸念がある場合：中毒センター、または医師に連絡する。患者を空気の新鮮な場所に移し、呼吸しやすい姿勢で休息させてください。内容物、容器は承認された廃棄物処理装置または廃棄物処理工場へ廃棄してください。

## 廃棄

廃棄物にはサンプルと試薬が含まれます。この廃棄物には毒性または感染性物質が含まれていることがあるため、適正に廃棄しなければなりません。適正な廃棄手順については、地域の安全規制を参照してください。

詳細は、適切な安全データシート（Safety Data Sheets, SDS）を参照してください。これらは、ウェブサイト（[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)）から PDF 形式にて取得できます。このサイトからは、QIAGEN キットとキットのコンポーネントの SDS を検索、表示、印刷できます。

## 試薬の保管と取り扱い

QIAamp Mini カラムは 2~8°C の乾燥した場所で保管し、バッファーはすべて室温（15~25°C）で保存してください。QIAamp Mini カラムとバッファーをこのような条件下で保存すると、キットボックスに表示されている有効期限まで性能が低下することはありません。

凍結乾燥した担体 RNA は、コンポーネントラベルに表示されている有効期限まで室温（15~25°C）で保存してください。担体 RNA は Buffer AVE に溶解し、溶解した担体 RNA は、Breeze プロトコールでは 30 ページ、クラシックプロトコールでは 35 ページに記載の通り、直ちに Buffer ACL に添加してください。この溶液は新しく調製する必要があります。Buffer AVE に溶解した担体 RNA の未使用分は、アリコートに分けて-30°C~-15°C で保存してください。

QIAamp DSP Circulating NA Kit には、すぐに使用できるプロテインキナーゼ K 溶液が含まれており、特別に調製した保存バッファーに溶解します。プロテインキナーゼ K は、室温（15~25°C）で保存すると、コンポーネントラベルに記載の有効期限まで安定しています。

## 使用中の安定性

このキットは、最初に使用してから 12 ヶ月中か、使用期限までのうちいずれかより早いほうまで使用できます。

# 標本の保管と取り扱い

## 血液の保管と取り扱い

無細胞核酸の分解と細胞核酸の放出を避けるため、全血を 2°C~8°C の温度で最長 6 時間保存することを推奨します (EDTA サンプルなど)。安定化した採取チューブを使用する際は、製造業者が示す保管条件を考慮してください。保管条件は、具体的なダウンストリームアプリケーションやターゲットと組み合わせて検証することを推奨します。

## 血漿の保管と取り扱い

特に RNA の場合、抗凝固剤として EDTA を使用する場合は、献血直後に血漿分離と核酸分離を行うことを推奨します。短期保管の場合には、血漿は 2°C~8°C の温度で最長 24 時間保管できます。

長期保管する場合は、安定化および非安定化血液採取チューブ由来の血漿アリコートを -20°C または -80°C で最長 12 ヶ月 (ターゲットが DNA についてのみ) あるいは -80°C で 4 週間 (ターゲットが RNA) 保管できます。

## 溶出した核酸の保管

溶出した核酸は 1.5 mL 溶出管 (付属) に回収します。精製した循環核酸は、2°C~8°C で最長 24 時間保管できます。24 時間以上保管する場合は、DNA では -30°C~-15°C の温度、RNA ダウンストリームアプリケーションでは -90°C~-60°C の温度でそれぞれ保管することを推奨します。

# 操作手順

## 開始する前の重要な留意点

### QIAvac 24 Plus

QIAvac 24 Plus は、最大 24 個の QIAGEN スピнкаラムを並行して高速かつ効率的に真空処理できるよう設計されています。サンプルと洗浄液は、遠心分離ではなく真空によってカラム膜を通して吸引されるため、精製手順がスピードアップし実施時間が短縮されます。

QIAvac Connecting System と組み合わせると、QIAvac 24 Plus をフロースルーシステムとして使用できます。サンプルフロースルーを別の廃液ボトルに回収します。

QIAvac 24 Plus のメンテナンスについては、*QIAvac 24 Plus* ハンドブックの取り扱いガイドラインを参照してください。

### QIAvac 24 Plus での QIAamp Mini カラムの処理

QIAamp Mini カラムは、使い捨ての VacConnector と再利用可能な VacValve を用いて QIAvac 24 Plus で処理します。VacValve (オプション) を QIAvac 24 Plus マニホールドのルアースロットに直接挿入すると一定の流速が確保されるため、様々な容量のサンプルの並行処理を容易に行うことができます。サンプルの流量が大幅に異なる場合は、一貫した真空を確保するために使用する必要があります。VacConnector は、QIAamp Mini カラムと VacValve の間、または QIAamp Mini カラムと QIAvac 24 Plus のルアースロットの間に収まる使い捨てコネクタです。精製中にスピнкаラムと VacValve が直接接触しないようにすることで、サンプル間のクロスコンタミネーションを防ぎます。VacConnector は、1 回使用したら破棄します。大量の溶液を使用するため、QIAvac Connecting System (または廃棄ボトルを備えた同様のセットアップ) が必要です (図 2 を参照)。

## QIAvac 24 Plus の取り扱いガイドライン

- QIAvac 24 Plus は必ず安全なベンチトップか作業エリアに設置してください。落下した場合、QIAvac 24 Plus マニホールドに亀裂が生じる可能性があります。
- QIAvac 24 Plus は常に清潔で乾燥した状態で保管してください。洗浄手順については、QIAvac 24 Plus ハンドブックを参照してください。
- QIAvac 24 Plus のコンポーネントは、特定の溶媒には耐性がありません（表 2）。このような溶媒がユニットにこぼれた場合は、水で十分に洗い流してください。
- 一貫した性能を確保するため、QIAvac 24 Plus マニホールドのいかなる部分にもシリコンや真空グリースを塗布しないでください。
- 加圧下の真空マニホールドの近くで作業する際は、常に注意を払い、安全眼鏡を着用してください。
- スペアまたは交換部品に関する情報については、QIAGEN テクニカルサービスまたは最寄りの代理店にお問い合わせください。
- 真空圧は、真空マニホールド内部と大気との差圧（標準大気圧は 1013 mbar または 760 mm Hg）であり、QIAvac Connecting System を使用して測定できます（図 2 を参照）。本プロトコルでは、-800~-900 mbar の真空を作り出せる真空ポンプが必要です（QIAGEN Vacuum Pump など）。これ以上の真空圧は避けてください。推奨値より低い真空圧を使用すると、核酸の収量と純度が低下し、膜が詰まるリスクが高まります。

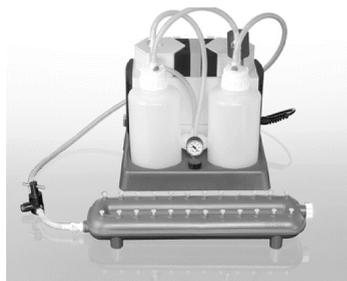


図 2. QIAvac 24 Plus、QIAvac Connecting System、Vacuum Pump。

表 2. QIAvac 24 Plus の耐薬品性

耐性を示す化学薬品		耐性示さない化学薬品
酢酸	カオトロピック塩	ベンゼン
クロム酸	濃縮アルコール	フェノール
SDS	塩化ナトリウム	クロロホルム
Tween™ 20	尿素	トルエン
塩素漂白剤	塩酸	エーテル
水酸化ナトリウム		

## QIAvac 24 Plus vacuum manifold のセットアップ

1. QIAvac 24 Plus を真空源に接続します。QIAvac Connecting System を使用する場合は、QIAvac 24 Plus ハンドブックの付録 A に記載の通り、システムをマニホールドと真空源に接続します。
2. VacValve (オプション) を、使用する QIAvac 24 Plus の各ルアースロットに挿入します (図 3 を参照)。使用しないルアースロットをルアープラグで閉じるか、挿入した VacValve を閉じます。  
 サンプルの流量が大幅に異なる場合は、真空を一定に保つために VacValve を使用する必要があります。
3. VacConnector を各 VacValve に挿入します (図 3 を参照)。  
 VacConnector が空气中に存在する可能性がある汚染物質に曝露されないよう、精製開始直前にこのステップを実行します。
4. QIAamp Mini カラムをマニホールド上の VacConnector に配置します (図 3 を参照)。  
**注:** ブリスターパックから洗浄チューブを取り出し、精製プロトコールに使用します。

5. カラムエクステンダー（20 mL）を各 QIAamp Mini カラムに挿入します（図 3 を参照）。

**注釈：**サンプルの漏れを防ぐため、カラムエクステンダーが QIAamp Mini カラムにしっかりと挿入されていることを確認します。

6. 核酸精製についてはプロトコールの指示に従ってください。使用後は、VacConnector を適切に廃棄してください。

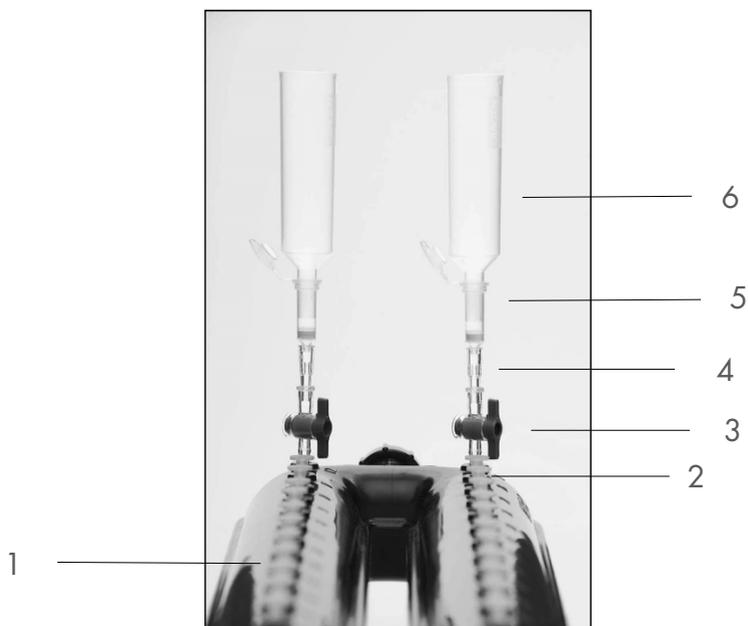
真空適用時は、QIAamp Mini カラムの蓋を開けたままにします。

ステップとステップの間は真空をオフにして、処理中に一貫した均一な真空が適用されるようにします。高速真空リリースには、Vacuum Regulator を使用する必要があります（QIAvac Connecting System の一部）。

**注：**サンプルがスピнкаラムから完全に吸引されると各 VacValve を個別に閉じることができ、容積や粘度の異なるサンプルの並行処理が可能です。

7. サンプル処理後、QIAvac 24 Plus を洗浄します（QIAvac 24 Plus ハンドブックの「QIAvac 24 Plus」のクリーニングと除染」参照）。

**注釈：**Buffer ACL、ACB、ACW1 は漂白剤を含む消毒剤には対応していません。警告と注意については、14 ページを参照してください。

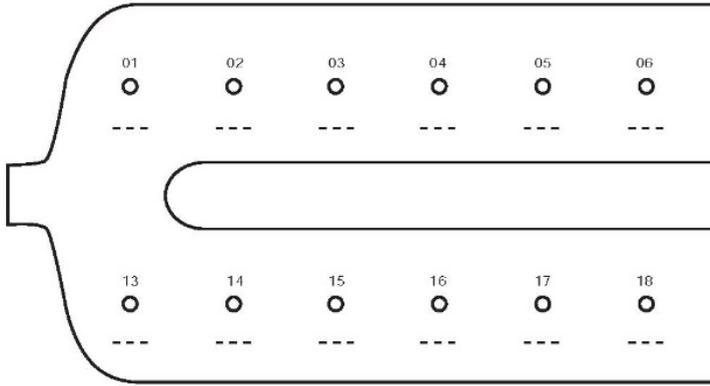


**図 3. VacValve、VacConnector、カラムエクステンダーを使用した QIAamp Mini カラムを備えた QIAvac 24 Plus のセットアップ。**

- |          |  |          |                 |
|----------|--|----------|-----------------|
| <b>1</b> | QIAvac 24 Plus vacuum manifold         | <b>4</b> | VacConnector    |
| <b>2</b> | QIAvac 24 Plus のルアースロット<br>(ルアープラグで閉鎖) | <b>5</b> | QIAamp Mini カラム |
| <b>3</b> | VacValve*                              | <b>6</b> | カラムエクステンダー      |

サンプルの混同を防ぐため、図 4 のスキームにしたがって、QIAvac 24 Plus 真空システムに使用するチューブと QIAamp Mini カラムにラベルを貼付することを推奨します。この図をコピーしてサンプル名のラベルを付けられます。

\* 別途購入する必要があります。



日付： \_\_\_\_\_

オペレーター： \_\_\_\_\_

実行ID： \_\_\_\_\_

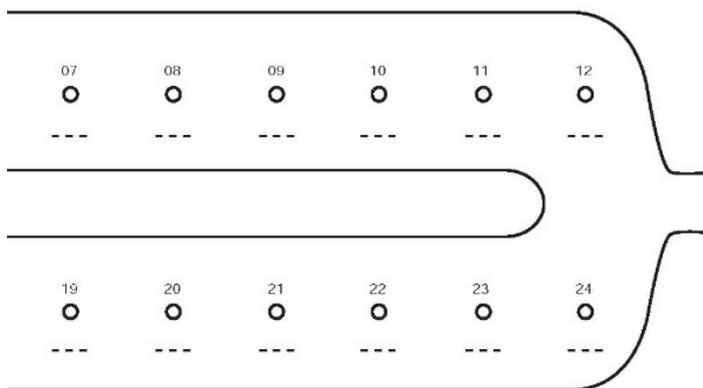


図 4. QIAvac 24 Plus 真空システムで使用するチューブと QIAamp Mini カラムのラベル貼付スキーム。

# バッファーと試薬の調製

## Buffer ACB

使用前に、200 mL のイソプロパノール（100%）を 300 mL の濃縮 Buffer ACB に加え、500 mL の Buffer ACB とします。イソプロパノール添加後、よく混ぜます。

## Buffer ACW1\*

使用前に、25 mL のエタノール（96～100%）を 19 mL の濃縮 Buffer ACW1 に加え、44 mL の Buffer ACW1 とします。エタノール添加後、よく混ぜます。

## Buffer ACW2†

使用前に、30 mL のエタノール（96～100%）を 13 mL の濃縮 Buffer ACW2 に加え、43 mL の Buffer ACW2 とします。エタノール添加後、よく混ぜます。

## 担体 RNA を Buffer ACL に添加\*

担体 RNA には 2 つの目的があります。ひとつは、特にサンプル中の標的分子が非常に少ない場合に、QIAamp Mini 膜への核酸の結合を強化することです。もうひとつは、大量の担体 RNA を添加すると、まれに RNase 分子が Buffer ACL 中のカオトロピック塩と洗浄剤による変性を受けず、RNA の分解の可能性が低下します。

付属の凍結乾燥担体 RNA の量は、キットに付属の Buffer ACL に十分な量です。担体 RNA の推奨濃度は、QIAamp DSP Circulating NA プロトコルを多様な増幅システムと互換性のある一般的な精製システムとして使用できるよう調整されており、幅広い RNA および DNA ターゲットに適しています。

\* カオトロピック塩を含む。Warnings and Precautions については、14 ページを参照してください。

† 保存料としてアジ化ナトリウムを含む。

増幅システムの効率性は、反応に存在する核酸の総量に応じて異なります。キットの溶出液には循環核酸と担体 RNA の両方が含まれており、大半の場合、担体 RNA の量は循環核酸の量を大きく超えます。そのため、UV 吸光度の読み取りによる単離循環核酸の定量は、測定結果が担体 RNA の存在によって決まるため適切ではありません。

増幅反応で最高レベルの感度を得るため、Buffer ACL に添加する担体 RNA の量を減らす必要がある場合があります。

オリゴ dT プライマーを含む増幅システムでは、遊離循環核酸の分離中に担体 RNA を追加しないでください。

1550  $\mu\text{L}$  の Buffer AVE\* を、310  $\mu\text{g}$  の凍結乾燥担体 RNA を入れたチューブに加え、濃度 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  の溶液とします。担体 RNA を完全に溶解し、便利なサイズのアリコートに分け、 $-30^{\circ}\text{C}\sim-15^{\circ}\text{C}$  の温度で保存します。担体 RNA のアリコートを繰り返し凍結融解しないでください。

担体 RNA は Buffer ACL に溶解しないことにご注意ください。Buffer AVE に溶解後、Buffer ACL に追加します。

プロトコールの表にしたがって、サンプルのバッチごとに必要な Buffer ACL-担体 RNA 混合液の量を計算します。同時に処理するサンプル数を選択します。

チューブまたはボトルをそっと 10 回反転させ、混合します。泡立たないように、ボルテックスしないでください。

\* 保存料としてアジ化ナトリウムを含む。

**注:** サンプル調製手順は、サンプル 1 つあたり最大 1.0  $\mu\text{g}$  の担体 RNA に対して最適化されています。これより少量の担体 RNA がお使いの増幅システムに適していると示されている場合、必要な量の溶解担体 RNA のみを Buffer ACL を含むチューブに移します。1 回の調製に必要な担体 RNA 1  $\mu\text{g}$  ごとに、溶解した担体 RNA 5  $\mu\text{L}$  を Buffer ACL に追加します。  
(サンプルあたり 1.0  $\mu\text{g}$  未満の担体 RNA を使用すると有益な場合があります。サンプルタイプごとおよびダウンストリームアッセイごとに検証する必要があります。)

# Breeze プロトコール：1～5 mL のヒト血漿から循環核酸を精製

本プロトコールは、1～5 mL のヒト血漿から循環 DNA および RNA を精製するためのもので、実施時間と所要時間が短縮するように最適化されています。QIAamp DSP Circulating NA Kit バージョン 1/R3 を使用する既存のユーザー検証ワークフローについては、「クラシックプロトコール：1～5 mL のヒト血漿からの循環核酸の精製」をご参照ください（34 ページ）。

## 開始する前の重要な留意点

- 遠心分離ステップはすべて、室温（15～25°C）で行います。
- ステップとステップの間は真空をオフにして、プロトコールステップ中に一貫した均一な真空が適用されるようにします。  
注: 真空ポンプ圧を-800 mbar～-900 mbar にします。
- サンプル温度を室温にします。
- PBS を使用して、サンプル量を最も近い正確な容積（1～5 mL）にします。
- 21 ページに記載する通り、QIAvac 24 Plus をセットアップします。
- 水槽またはヒートブロックを 56°C まで加熱し、ステップ 3 で 50 mL 遠心管とともに使用します。
- 使用前に、QIAamp Mini スピンカラムを最低 1 時間室温にします。
- 26 ページの指示にしたがって、Buffer ACB、Buffer ACW1、Buffer ACW2 が調製（イソプロパノールまたはエタノールを添加）されていることを確認してください。
- 表 3 の指示にしたがって、Buffer AVE 中に再構成した担体 RNA を Buffer ACL に加えます。

表 3.1~5 mL のヒト血漿サンプルの処理に必要な Buffer ACL と担体 RNA (Buffer AVE に溶解) の量

血漿 (mL) のセット アップ	A	B	C	D	E	
	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	
サンプル数	Buffer ACL (mL)					Buffer AVE 中の担 体 RNA (μL)
1	0.9	1.8	2.6	3.5	4.4	5.6
2	1.8	3.5	5.3	7.0	8.8	11.3
3	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	16.9
4	3.5	7.0	10.6	14.1	17.6	22.5
5	4.4	8.8	13.2	17.6	22.0	28.1
6	5.3	10.6	15.8	21.1	26.4	33.8
7	6.2	12.3	18.5	24.6	30.8	39.4
8	7.0	14.1	21.1	28.2	35.2	45.0
9	7.9	15.8	23.8	31.7	39.6	50.6
10	8.8	17.6	26.4	35.2	44.0	56.3
11	9.7	19.4	29.0	38.7	48.4	61.9
12	10.6	21.1	31.7	42.2	52.8	67.5
13	11.4	22.9	34.3	45.8	57.2	73.1
14	12.3	24.6	37.0	49.3	61.6	78.8
15	13.2	26.4	39.6	52.8	66.0	84.4
16	14.1	28.2	42.2	56.3	70.4	90.0
17	15.0	29.9	44.9	59.8	74.8	95.6
18	15.8	31.7	47.5	63.4	79.2	101.3
19	16.7	33.4	50.2	66.9	83.6	106.9
20	17.6	35.2	52.8	70.4	88.0	112.5
21	18.5	37.0	55.4	73.9	92.4	118.1
22	19.4	38.7	58.1	77.4	96.8	123.8
23	20.2	40.5	60.7	81.0	101.2	129.4
24	21.1	42.2	63.4	84.5	105.6	135.0

## 操作手順：Breeze プロトコール

1. QIAGEN Proteinase K、血漿、Buffer ACL をこの順番で 50 mL 遠心管（別途ご用意ください）にピペットで移します。

セットアップ	A	B	C	D	E
ProtK (μl)	100	200	300	400	500
血漿 (mL)	1	2	3	4	5
ACL (mL)	0.8	1.6	2.4	3.2	4

2. キャップを閉め、パルスボルテックスにより 5 回 x2 秒間混合します。

チューブ内に目に見えるボルテックス泡が形成されていることを確認してください。効率的に溶解するには、サンプルと Buffer ACL を完全に混合して均一な溶液を得る必要があります。

**注釈：**この時点で操作手順を中断しないでください。直ちにステップ 3 に進み、溶解インキュベーションを開始します。

3. 56°C (±1°C) で 15 (±1) 分間インキュベートします。
4. チューブを実験台に戻し、キャップを外します。
5. チューブ内の溶解物に Buffer ACB を加えます。ステップ 1 のセットアップにしたがって量を選択します。

セットアップ	A	B	C	D	E
ACB (mL)	1.8	3.6	5.4	7.2	9

6. キャップを閉め、パルスボルテックスにより 5 回 x 2 秒間完全に混合します。

チューブ内に目に見えるボルテックス泡が形成されていることを確認してください。効率的に溶解するためには、溶解物と Buffer ACB を完全に混合して均一な溶液を得る必要があります。

7. チューブの溶解物-Buffer ACB 混合液を室温で 5 (±1) 分間インキュベートします。
8. QIAamp Mini カラムを QIAvac 24 Plus 上の VacConnector に挿入します (21 ページの「QIAvac 24 Plus vacuum manifold のセットアップ」を参照)。20 mL のカラムエクステンダーを、開いている QIAamp Mini カラムに挿入します。

サンプルが漏れないように、カラムエクステンダーを QIAamp Mini カラムにしっかりと挿入してください。

**注:** ステップ 13 のドライスピン用に洗浄チューブを保管します。

9. ステップ 7 の溶解物を QIAamp Mini カラムのカラムエクステンダーに慎重に入れます。真空ポンプのスイッチを入れます。すべての溶解物がカラムに完全に吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り圧力を 0 mbar までリリースします。カラムエクステンダーを慎重に取り外し、廃棄します。

大量のサンプル溶解物 (5 mL のサンプルから開始する場合は約 18 mL) が真空の力で QIAamp Mini 膜を通過するには、最長で 20 分かかる場合があります。

真空圧を高速かつ簡便にリリースするには、Vacuum Regulator を使用する必要があります (QIAvac Connecting System の一部)。

**注:** クロスコンタミネーションを防ぐため、カラムエクステンダーを取り外している時に QIAamp Mini カラムを交差させないように注意します。

10. 600 µL の Buffer ACW1 を QIAamp Mini カラムに入れます。カラムの蓋を開けたままにして、真空ポンプのスイッチを入れます。Buffer ACW1 がすべて QIAamp Mini カラムに吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を 0 mbar までリリースします。
11. 750 µL の Buffer ACW2 を QIAamp Mini カラムに入れます。カラムの蓋を開けたままにして、真空ポンプのスイッチを入れます。Buffer ACW2 がすべて QIAamp Mini カラムに吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を 0 mbar までリリースします。
12. 750 µL のエタノール (96~100%) を QIAamp Mini カラムに入れます。カラムの蓋を開けたままにして、真空ポンプのスイッチを入れます。エタノールがすべてスピンカラムに吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を 0 mbar までリリースします。

13. QIAamp Mini カラムの蓋を閉じます。真空マニホールドから取り外し、VacConnector を廃棄します。QIAamp Mini カラムを清潔な 2 mL 洗浄チューブに入れ（ステップ 8）、最高速度（20,000 x g、14,000 rpm）で 3（±0.5）分間遠心分離します。

14. QIAamp Mini カラムを新しい 2 mL 洗浄チューブに入れます。蓋を開け、アセンブリーを室温で 3 分間インキュベートして膜を完全に乾燥させます。

15. QIAamp Mini カラムを清潔な 1.5 mL 溶出チューブ（付属）に入れ、ステップ 14 の 2 mL 洗浄チューブを廃棄します。20~150  $\mu$ L の Buffer AVE を、QIAamp Mini カラム膜の中心に慎重に置きます。蓋を閉め、室温で 3（±0.5）分間インキュベートします。

**重要：**溶出 Buffer AVE が室温（15~25°C）と平衡になるようにします。少量（<50  $\mu$ L）で溶出する場合、膜中心に溶出バッファーを分注し、結合した核酸を完全に溶出させる必要があります。

溶出量には柔軟性があり、ダウンストリームアプリケーションの要件に応じて調整可能です。

少量の Buffer AVE で溶出すると核酸濃度は高くなりますが、総収量が低下する可能性があります。

回収される溶出液量は、QIAamp Mini カラムの膜に適用される溶出量より最大 5  $\mu$ L 少なくなることがあります。

**注：**低い核酸収量が想定される場合、ローバインドチューブ（別途ご用意ください）での溶出を推奨します。

16. マイクロ遠心機を用いて最高速度（20,000 x g、14,000 rpm）で 1 分間遠心分離し、核酸を溶出させます。

**注釈：**ローターの回転方向の逆を指すように蓋の向きを揃えます（たとえば、時計方向の回転の場合は、蓋が反時計回りを指すようにします）。

# クラシックプロトコール：1～5 mL のヒト血漿からの循環核酸の精製

本プロトコールは、QIAamp DSP Circulating NA Kit ハンドブック、改訂第3版（R3）のプロトコールと同じであり、1 mL～5 mL のヒト血漿用の既存のユーザー検証ワークフローなどと使用します。

## 開始する前の重要な留意点

- 遠心分離ステップはすべて、室温（15～25°C）で行います。
- ステップとステップの間は真空をオフにして、プロトコールステップ中に一貫した均一な真空が適用されるようにします。  
注：真空ポンプ圧を-800～-900 mbar にします。
- サンプル温度を室温にします。
- PBS を使用して、サンプル量を最も近い正確な容積（1～5 mL）にします。
- 21 ページに記載する通り、QIAvac 24 Plus をセットアップします。
- 水槽またはヒートブロックを 60°C まで加熱し、ステップ 3 で 50 mL 遠心管とともに使用します。
- ヒートブロックを 56°C まで加熱し、ステップ 14 で 2 mL 洗浄チューブとともに使用します。
- 使用前に、QIAamp Mini スピニングカラムを最低 1 時間室温にします。
- 26 ページの指示にしたがって、Buffer ACB、Buffer ACW1、Buffer ACW2 が調製（イソプロパノールまたはエタノールを添加）されていることを確認してください。
- 表 4 の指示にしたがって、Buffer AVE 中に再構成した担体 RNA を Buffer ACL に加えます。

表 4.1~5 mL のヒト血漿サンプルの処理に必要な Buffer ACL と担体 RNA (Buffer AVE に溶解) の量

血漿 (mL) のセット アップ	A	B	C	D	E	
	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	
サンプル数	Buffer ACL (mL)					Buffer AVE 中の 担体 RNA (μL)
1	0.9	1.8	2.6	3.5	4.4	5.6
2	1.8	3.5	5.3	7.0	8.8	11.3
3	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	16.9
4	3.5	7.0	10.6	14.1	17.6	22.5
5	4.4	8.8	13.2	17.6	22.0	28.1
6	5.3	10.6	15.8	21.1	26.4	33.8
7	6.2	12.3	18.5	24.6	30.8	39.4
8	7.0	14.1	21.1	28.2	35.2	45.0
9	7.9	15.8	23.8	31.7	39.6	50.6
10	8.8	17.6	26.4	35.2	44.0	56.3
11	9.7	19.4	29.0	38.7	48.4	61.9
12	10.6	21.1	31.7	42.2	52.8	67.5
13	11.4	22.9	34.3	45.8	57.2	73.1
14	12.3	24.6	37.0	49.3	61.6	78.8
15	13.2	26.4	39.6	52.8	66.0	84.4
16	14.1	28.2	42.2	56.3	70.4	90.0
17	15.0	29.9	44.9	59.8	74.8	95.6
18	15.8	31.7	47.5	63.4	79.2	101.3
19	16.7	33.4	50.2	66.9	83.6	106.9
20	17.6	35.2	52.8	70.4	88.0	112.5
21	18.5	37.0	55.4	73.9	92.4	118.1
22	19.4	38.7	58.1	77.4	96.8	123.8
23	20.2	40.5	60.7	81.0	101.2	129.4
24	21.1	42.2	63.4	84.5	105.6	135.0

## 操作手順：クラシックプロトコール

1. QIAGEN Proteinase K、血漿、Buffer ACL をこの順番で 50 mL 遠心管（別途ご用意ください）にピペットで移します。

セットアップ	A	B	C	D	E
ProtK (μL)	100	200	300	400	500
血漿 (mL)	1	2	3	4	5
ACL (mL)	0.8	1.6	2.4	3.2	4

2. キャップを閉め、パルスボルテックスで 30 秒間混合します。  
チューブ内に目に見えるボルテックス泡が形成されていることを確認してください。効率的に溶解するには、サンプルと Buffer ACL を完全に混合して均一な溶液を得る必要があります。  
**注釈：**この時点で操作手順を中断しないでください。直ちにステップ 3 に進み、溶解インキュベーションを開始します。
3. 60°C (±1°C) で 30 (±2) 分間インキュベートします。
4. チューブを実験台に戻し、キャップを外します。
5. チューブ内の溶解物に Buffer ACB を加えます。ステップ 1 のセットアップにしたがって量を選択します。

セットアップ	A	B	C	D	E
ACB (mL)	1.8	3.6	5.4	7.2	9

6. キャップを閉め、パルスボルテックスで 30 秒間完全に混合します。  
チューブ内に目に見えるボルテックス泡が形成されていることを確認してください。効率的に溶解するためには、溶解物と Buffer ACB を完全に混合して均一な溶液を得る必要があります。

- チューブ内の溶解物-Buffer ACB の混合を、5 ( $\pm$ 1) 分間氷上でインキュベートします。
- QIAamp Mini カラムを QIAvac 24 Plus 上の VacConnector に挿入します (21 ページの「QIAvac 24 Plus vacuum manifold のセットアップ」を参照)。20 mL のカラムエクステンダーを、開いている QIAamp Mini カラムに挿入します。

サンプルが漏れないように、カラムエクステンダーを QIAamp Mini カラムにしっかりと挿入してください。

**注:** ステップ 13 のドライスピンのために洗浄チューブを保管します。

- ステップ 7 の溶解物を QIAamp Mini カラムのカラムエクステンダーに慎重に入れます。-800~-900 mbar の圧力をかけて真空ポンプのスイッチを入れます。すべての溶解物がカラムに完全に吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り圧力を 0 mbar までリリースします。カラムエクステンダーを慎重に取り外し、廃棄します。

大量のサンプル溶解物 (5 mL のサンプルから開始する場合は約 18 mL) が真空の力で QIAamp Mini 膜を通過するには、最長で 20 分かかる場合があります。

真空圧を高速かつ簡便にリリースするには、Vacuum Regulator を使用する必要があります (QIAvac Connecting System の一部)。

**注:** クロスコンタミネーションを防ぐため、カラムエクステンダーを取り外している時に QIAamp Mini カラムを交差させないように注意します。

- 600  $\mu$ L の Buffer ACW1 を QIAamp Mini カラムに入れます。カラムの蓋を開けたままにして、真空ポンプのスイッチを入れます。Buffer ACW1 がすべて QIAamp Mini カラムに吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を 0 mbar までリリースします。
- 750  $\mu$ L の Buffer ACW2 を QIAamp Mini カラムに入れます。カラムの蓋を開けたままにして、真空ポンプのスイッチを入れます。Buffer ACW2 がすべて QIAamp Mini カラムに吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を 0 mbar までリリースします。
- 750  $\mu$ L のエタノール (96~100%) を QIAamp Mini カラムに入れます。カラムの蓋を開けたままにして、真空ポンプのスイッチを入れます。エタノールがすべてスピンカラムに吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を 0 mbar までリリースします。

13. QIAamp Mini カラムの蓋を閉じます。真空マニホールドから取り外し、VacConnector を廃棄します。QIAamp Mini カラムを清潔な 2 mL 洗浄チューブに入れ（ステップ 8）、最高速度（20,000 x g、14,000 rpm）で 3（±0.5）分間遠心分離します。
14. QIAamp Mini カラムを新しい 2 mL 洗浄チューブに入れます。蓋を開け、アセンブリーを 56°C（±1°C）で 10（±1）分間インキュベートし、膜を完全に乾燥させます。
15. QIAamp Mini カラムを清潔な 1.5 mL 溶出チューブ（付属）に入れ、ステップ 13 の 2 mL 洗浄チューブを廃棄します。20~150 µL の Buffer AVE を QIAamp Mini カラム膜の中心に慎重に置きます。蓋を閉め、室温で 3（±0.5）分間インキュベートします。
- 重要:** 溶出 Buffer AVE が室温（15~25°C）と平衡になるようにします。少量（<50 µL）で溶出する場合、膜中心に溶出バッファーを分注し、結合した核酸を完全に溶出させる必要があります。

溶出量には柔軟性があり、ダウンストリームアプリケーションの要件に応じて調整可能です。

少量の Buffer AVE で溶出すると核酸濃度は高くなりますが、総収量が低下する可能性があります。

回収される溶出液量は、QIAamp Mini カラムに適用される溶出量より最大 5 µL 少なくなることがあります。

**注:** 低い核酸収量が想定される場合、ローバインドチューブ（別途ご用意ください）での溶出を推奨します。

16. マイクロ遠心機を用いて最高速度（20,000 x g、14,000 rpm）で 1 分間遠心分離し、核酸を溶出させます。

**注釈:** ローターの回転方向の逆を指すように蓋の向きを揃えます（たとえば、時計方向の回転の場合は、蓋が反時計回りを指すようにします）。

## 品質管理

QIAGEN の ISO 認証済み品質管理システムにより、QIAamp DSP Circulating NA Kit の各ロットは既定の仕様に対して検査され、一貫した製品品質が確保されます。

## 制限事項

循環無細胞核酸を分離するシステム性能は、以下の採取チューブから生成されたヒト血漿サンプルを使用して確立されています。

- K2-EDTA (Beckton Dickinson and Company、カタログ番号 367525)
- PAXgene® Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX、カタログ番号 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck、カタログ番号 218962)

QIAGEN の性能評価試験の対象外の操作手順については、システム性能を検証する責任はユーザーにあります。

診断結果に悪影響が及ぶリスクを最小限に抑えるため、ダウンストリームプロセスを適切に管理する必要があります。さらなる検証には、分析手順の ICH Q2 (R1) バリデーションにおける医薬品規制調和国際会議 (ICH) のガイドライン：Text And Methodology (テキストと方法) が推奨されます。

本品がもたらすすべての診断結果は、他の臨床、ラボ操作による所見と併用して解釈されるべきものです。

## 性能特性

該当する性能特性は、[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) の製品ページのリソースタブに記載されています。

## 参照

1. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Levy, B. (2019) *Prenatal Diagnosis. Methods in Molecular Biology*. 2nd ed. New York: Humana Press.
3. Hahn, S. and Zimmermann, B.G. (2010) Cell-free DNA in maternal plasma: has the size-distribution puzzle been solved? *Clin Chem*. **56**, 1210-1211.
4. Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., and Calin, G. (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 541-563.
5. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. *Genome Med* **10**, 21.
6. Terrinoni, A., et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med*. **57**, 932-953.

# トラブルシューティングガイド

このトラブルシューティングガイドは何らかの問題が発生した際にお役に立てください。詳細については、当社のテクニカルサポートセンターの「よくある質問 (Frequently Asked Questions, FAQ)」：[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx) を参照してください。QIAGEN テクニカルサービスの専門チームは、このハンドブックに掲載している情報とプロトコールに加え、サンプルやアッセイの技術についてのご質問にお答えしています（連絡方法については、[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) をご参照ください）。

## コメントと推奨事項

### 溶出液中に核酸がほとんどまたはまったくない

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| a) 非安定化血漿の使用                    | 非安定化血漿サンプルは DNA の分解を促進する可能性があります。CEN/TS 16835-3:2015 に従うことを推奨します。新しいサンプルで精製手順を繰り返してください。                           |
| b) 採血から血漿調製までの時間が長い             | 有核血球が分解してゲノム DNA を血漿に放出し、標的核酸が希釈される可能性があります。   |
| c) 複数回凍結融解したサンプル                | DNA 分解につながる可能性があるため凍結融解の繰り返しは避けてください。必ず新鮮なサンプル、または 1 回のみ融解したサンプルを使用してください。   |
| d) サンプル中のターゲット DNA が低濃度         | 血漿サンプルが室温で長時間放置されました。新しいサンプルで精製手順を繰り返してください。<br><b>注釈：</b> 血漿中の無細胞 NA 濃度が低い人もいます。その場合、サンプル量を増やし、溶出液量を少なくする必要があります。 |
| e) Buffer ACL へのサンプル溶解が非効率的     | QIAGEN Proteinase K が長時間高温状態にあると、活性が失われる可能性があります。新しいサンプルと新鮮な QIAGEN Proteinase K を用いて手順を繰り返してください。                 |
| f) Buffer ACL-担体 RNA 混合物の混合が不十分 | Buffer ACL-担体 RNA の入ったチューブを最低 10 回静かに反転させて、Buffer ACL と担体 RNA を混合します。  |

## コメントと推奨事項

- |    |  |  |
|----|--|--|
| g) | 96～100%ではなく低濃度エタノールを使用                         | 新しいサンプルと 96～100%エタノールを用いて精製手順を繰り返してください。変性アルコールは使用しないでください。これは、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です。  |
| h) | Buffer ACB が正しく調製されていない                        | 濃縮 Buffer ACB が正しい量のイソプロパノールで再構成されていることを確認してください（エタノールではありません。26 ページ参照）。                         |
| i) | Buffer ACW1 または Buffer ACW2 が正しく調製されていない       | 濃縮 Buffer ACW1 と Buffer ACW2 が正しい量のエタノールで希釈されていることを確認してください（26 ページ参照）。新しいサンプルで精製手順を繰り返してください。    |
| j) | Buffer ACW1 または Buffer ACW2 が 70%エタノールで調製されている | 濃縮 Buffer ACW1 と Buffer ACW2 が 96～100%エタノールで希釈されていることを確認してください（26 ページ参照）。新しいサンプルで精製手順を繰り返してください。 |

## DNA や RNA がダウンストリーム酵素反応で十分な性能を示さない

- |    |                          |  |
|----|--------------------------|--|
| a) | 溶出液中に DNA がほとんどまたはまったくない | 考えられる理由については、上記「溶出液中に核酸がほとんどまたはまったくない」を参照してください。可能な場合は、反応に添加する溶出液の量を増やしてください。  |
| b) | 使用した溶出量が不適切              | ダウンストリームアプリケーションに適した最大溶出液量を決定してください。それにしたがって、ダウンストリームアプリケーションに追加する溶出液量を調製してください。溶出量はそれに合わせて調整できます。<br><br>注: 少量の Buffer AVE で溶出すると核酸濃度は高くなりますが、総収量が低下する可能性があります。 |
| c) | バッファが完全に混合されていない         | 次の実行までの放置時間が長いと、洗浄バッファ-ACW2 の塩とエタノール成分が分離します。各実行前に必ずバッファを完全に混合してください。  |
| d) | 担体 RNA による干渉             | 溶出液中の担体 RNA がダウンストリームの酵素反応を妨げる場合は、担体 RNA の量を減らすか完全に省略する必要がある場合があります。   |

## 取り扱い全般

- |    |                         |                            |
|----|-------------------------|----------------------------|
| a) | Clogged QIAamp Mini カラム | 流量を減少すると、真空時間を延長することができます。 |
|----|-------------------------|----------------------------|

## コメントと推奨事項

または、VacValveを使用する場合は閉じて、カラムエクステンダー中の溶解産物を失わないように注意しながら、QIAamp Mini カラムからカラムエクステンダー-VacConnector-VacValve アセンブリーを慎重に取り外してください。

QIAamp Mini カラムを真空マニホールドから取り外し、2 mL の洗浄チューブに入れ、サンプルが膜を完全に通過するまで最高速度で回転させてください。残りの溶解産物を含むカラムエクステンダー-VacConnector-VacValve アセンブリーを交換してください。真空ポンプのスイッチを入れ、VacValve を開き、残りの溶解産物の充填を続けてください。

QIAamp Mini カラムが詰まり続ける場合は、上記の手順を繰り返してください。

凍結融解の繰り返しにより、血漿中にクリオプレシピテートが形成された可能性があります。これにより QIAamp Mini カラムが詰まる可能性があります。凍結融解を繰り返した血漿は使用しないでください。

クリオプレシピテートが目に見える場合は、16,000 x g で 5 分間遠心分離してサンプルを透明にしてください。

### b) 溶出量の変動

サンプルによっては最終溶出液量に影響が及ぶ可能性があります。回収される溶出液量は、QIAamp Mini カラムに適用される溶出量より最大 5  $\mu$ L 少なくなることがあります。

## コメントと推奨事項

- c) -800~-900 mbar の真空圧に到達していない

真空マニホールドがしっかりと閉じていません。真空スイッチをオンにして、真空マニホールドの蓋を押し下げてください。真空圧に達しているか確認してください。

QlAvac の蓋のガスケットが摩耗しています。マニホールドのシールを目視で確認し、必要に応じて交換してください。

VacValve が摩耗しています。すべての VacValve を取り外し、VacConnector を直接ルアーエクステンションに挿入してください。QlAamp Mini カラムを VacConnector に挿入し、カラムの蓋を閉じて真空のスイッチを入れてください。真空圧に達しているか確認してください。必要に応じて VacValve を交換してください。

真空ポンプへの接続に漏れがあります。すべてのルアーエクステンションをルアーキャップで閉じ、真空ポンプのスイッチを入れてください。ポンプのスイッチを入れ（さらに Vacuum Regulator バルブを閉じた）後、真空圧が安定しているか確認してください。必要に応じて、ポンプと真空マニホールドの接続部を交換してください。

それでも真空圧に到達しない場合は、真空ポンプをより強力なポンプと交換してください。

## 図記号

使用説明書やパッケージとラベルには、次の図記号が表示されます。

図記号	図記号の定義
	<N>回の反応に必要な試薬が含まれます。
	使用者
	本製品は、体外診断用医療機器に関する欧州規制 2017/746 の要件を満たしています。
	体外診断薬キット
	カタログ番号
	ロット番号
	資材番号（コンポーネントのラベル）
	コンポーネント
	含有物質
	番号
	グローバルトレードアイテム番号

## 図記号

## 図記号の定義

Rn	R は使用説明書の改訂を示し、n は改訂番号を示す。
	温度制限
	製造者
	製品説明書参照
	直射日光を避けること
	警告／注意
	納品時
	納入時に開封：QIAamp Mini Spin カラムを 2～8°C で保管
	容量
	追加

## 図記号

## 図記号の定義



エタノールをボトルに追加後、現在の日付を記入します



エタノール



イソプロパノールをボトルに追加後、現在の日付を記入します



イソプロパノール

→

結果



チオンアン酸グアニジン



塩酸グアニジン



BRIJ 58



Proteinase K (プロテイナーゼ K)



医療機器個体識別子 (Unique device identifier)

## 付録 A：血漿の分離と保管に関する勧告

血液採取チューブ（PAXgene ccfDNA チューブや Streck 無細胞 DNA チューブなど）の安定化については、血漿の分離と保管に関する製造業者の指示に従ってください。保管条件は、具体的なダウンストリームアプリケーションやターゲットと組み合わせて検証することを推奨します。

非安定化 BCT については、ISO 20186-3:2019：分子 in vitro 診断検査 — 静脈全血の事前検査プロセスの仕様 — パート 3：血漿から循環遊離 DNA を分離、または CEN/TS 17742：分子 in vitro 診断検査 — 静脈全血の事前検査プロセスの仕様 — 血漿から循環遊離 RNA を分離に従うことを推奨します。

血液サンプルからの循環無細胞核酸の分離については、本プロトコールに従うことを推奨します。本プロトコールには、細胞破片を取り除くことでサンプル中の細胞またはゲノム DNA 量を減少させる高 g 力遠心分離ステップが含まれています。

1. EDTA 全血を BD Vacutainer®チューブ（または抗凝固剤として EDTA を含む他の主要な血液チューブ）に入れ、スイングアウトローターと適切なバケットを備えた 4°C に冷却した遠心分離機に入れます。
2. 血液サンプルを 4°C、1900 x g (3000 rpm) で 10 分間遠心分離します。
3. 血漿-細胞界面層を乱さないように注意しながら、血漿上清を慎重に吸引します。  
10 mL の主要血液チューブ 1 本から約 4 mL~5 mL の血漿が得られます。

**注:** この段階で、血漿を使用して循環核酸を抽出できます。しかしその後の高スピード遠心分離により、細胞破片と、損傷した有核血球由来のゲノム DNA と RNA による循環核酸の汚染がさらに除去されます。

4. 吸引した血漿を新しい遠心管に移します。
5. 血漿サンプルを 4°C、16,000 x g（固定角ローター使用）で 10 分間遠心分離します。

これによって、細胞破片に付着している余分な細胞核酸が除去されます。

6. 上清を慎重に取り出し、ペレットを乱さないように注意しながら新しいチューブに移します。
7. 同日に血漿を核酸抽出に使用する場合は、その後の処理まで 2°C~8°C で保管します。長期保管する場合は、安定化および非安定化採取チューブ由来の血漿アリコットを -20°C（ターゲットが DNA）または -80°C（ターゲットが RNA）で最低 4 週間保管できます。循環核酸抽出に血漿を使用する前に、室温で血漿チューブを融解します。
8. **オプション：**クリオプレシピテートを除去するため、血漿サンプルを 16,000 x g（固定角ローターを使用）で 5 分間遠心分離します。

**オプション：**上清を新しいチューブに移し、循環核酸抽出プロトコールを開始します。

# 付録 B: RNA 取り扱いの一般的注意事項

## RNA の取り扱い

リボヌクレアーゼ (RNases) は非常に安定した、活性の高い酵素で、通常補因子なしで機能します。RNases の不活性化は困難で、微量でも RNA を破壊します。そのため、プラスチックやガラス器具は RNase コンタミネーションを取り除いてから使用してください。精製の手順の最中とその後で、RNases が RNA に不意に混入しないよう、細心の注意を払ってください。RNase フリーな環境を設け、維持するには、RNA の取り扱いで使用する容器類（使い捨てであるか否かを問わず）と溶液の前準備で次の注意が必要です。

## 取り扱い全般

RNA の取り扱いでは、適切な微生物学的無菌操作を常に行います。手やほこりの粒子が細菌やカビを運ぶことがあります。これは RNase コンタミネーションの最も多くみられる原因です。試薬と RNA サンプルを取り扱う際には、皮膚表面や機器のほこりからの RNase コンタミネーションを防止するため、常にゴムまたはビニール手袋を使用してください。手袋は頻繁に交換し、チューブの蓋はできる限り閉じるようにします。精製した RNA をダウンストリームで使用するためにピペットで操作する場合、氷で冷却します。

## 使い捨てプラスチック製品

すべての操作手順で、殺菌済みの RNase を含まない使い捨てポリプロピレン器具の使用が推奨されます。

# 注文情報

製品	内容	カタログ番号
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	調製 50 回用: QIAamp Mini カラム、カラムエクステンダー、VacConnector、QIAGEN Proteinase K、試薬、バッファー、採取チューブ	61504
<b>アクセサリ</b>		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	1~24 スピнкаラム処理用真空マニホールド: QIAvac 24 Plus Vacuum manifold、ルアープラグ、クイックカップリング	19413
Vacuum Pump*	ユニバーサル真空ポンプ	84010 [米国とカナダ] 84000 [日本] 84020 [その他]
QIAvac Connecting System*	真空マニホールドと真空ポンプを接続するシステム: トレイ、廃棄ボトル、チューブ、カップリング、バルブ、ゲージ、24VacValve を含む	19419

\* 真空プロトコールで使用

最新のライセンス情報と製品ごとの免責事項については、該当する QIAGEN キット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 キットの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](http://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代理店からも入手可能です。

## 文書の改訂履歴

改訂	説明
R1、2022年6月	IVDR Kit バージョン 2 リリース、Kit バージョン 1 からのプロトコールまたは性能に変化なし、使用目的の「手動」分離の追加、軽微な更新と修正

このページは意図的に空白のままにしています

このページは意図的に空白のままにしています

#### QIAamp DSP Circulating NA Kit 限定ライセンス契約

本製品を使用することにより、本製品の購入者またはユーザーは以下の条項に合意し、本契約を締結したものとみなします。

1. 本製品は、本製品および本ハンドブックと共に提供されるプロトコルのみに従い、パネルに含まれるコンポーネントのみを用いて使用することができます。QIAGEN は、本製品と共に提供されるプロトコル、本ハンドブック、[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)に記載する追加プロトコルの中で説明されているものを除き、所有する知的財産に基づき、本パネルに含まれない一切のコンポーネントを、本パネルに同梱されるコンポーネントと共に使用したり、組み合わせたりするライセンスを一切許諾しません。追加プロトコルには、QIAGEN のユーザーが QIAGEN の他のユーザーに提供しているものがあります。このようなプロトコルは QIAGEN による完全なテストや最適化が施されていません。QIAGEN はこれらを保証せず、また、これらが第三者の権利を侵害しないことを保証しません。
2. 明示されたライセンスを除き、QIAGEN は本パネル、その使用、またはそれら両方が第三者の権利を侵害しないことを保証しません。
3. 本パネルとそのコンポーネントは 1 回のみ使用についてライセンスが許諾されるものであり、それらを再使用したり、再生したり、再販したりすることはできません。
4. QIAGEN は明確に表示されたものを除き、明示、黙示を問わず、他のライセンス許諾から明確に免責されます。
5. 本パネルの購入者とユーザーは、上記の禁止事項に示した行為を行わず、またかかる行為につながる、もしくは容易にする一切の手段をいずれの者にも許可しないことに同意します。QIAGEN は、本限定ライセンス契約の禁止事項の執行を法廷に対して強要することができ、本限定ライセンス契約、本パネルおよびそのコンポーネントに関する所有する知的財産権行使の一切の行為において、弁護士費用を含む調査と法的措置の経費を回収するものとします。

最新の契約条項は、ウェブサイト ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) を参照してください。

Trademarks: QIAGEN<sup>®</sup>、Sample to Insight<sup>®</sup>、QIAamp<sup>®</sup>、[QIAGEN Group]; Agilent<sup>®</sup> [Agilent Technologies, Inc.]、BD<sup>™</sup>、Vacutainer<sup>®</sup> [Becton Dickinson and Company]、PAXgene<sup>®</sup> [PreAnalytiX GmbH]、Tween<sup>™</sup> [ICI Americas Inc.]。本文書で使用した登録済みの名称、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を意味しません。

Jun-2022 HB-3049-001 1127632 © 2022 QIAGEN、無断複写・転載を禁じます。

