

2021 年 9 月

EZ1&2[®] DNA Investigator[®] Kit ハンドブック

EZ1[®]装置を使用して法医学およびヒト ID サンプルから DNA を自動精製

目次

キットの内容	4
出荷と保存	5
用途	5
安全情報	6
品質管理	6
はじめに	7
原理と手順	7
プロトコルの説明	9
ユーザーが準備する装置と試薬	11
重要な注意	13
スタートサンプル	13
EZ1 装置の操作	14
精製 DNA の収量	20
プロトコール：各種ケースワークおよびリファレンスサンプルの前処理	23
プロトコール：精子細胞が混合した上皮細胞の前処理	25
プロトコール：骨または歯からの DNA の抽出	27
プロトコール：土壌の前処理	29
プロトコール：DNA 精製（Trace プロトコール）	31
プロトコール：DNA 精製（「Tip Dance」プロトコール）	34
プロトコール：DNA 精製（Large-Volume プロトコール）	37
トラブルシューティングガイド	41
付録 A：EZ1 Advanced レポートファイルの例	43

オーダーインフォメーション	46
文書の改訂履歴	50

キットの内容

EZ1&2 DNA Investigator Kit	(48)
カタログ番号	952034
調製回数	48
Reagent Cartridge (試薬カートリッジ)、DNA Investigator*	48
Disposable Tip Holders (使い捨てチップホルダー)	50
Disposable Filter-Tips (使い捨てフィルターチップ)	50
Sample Tube (サンプルチューブ) (2 mL)	50
Elution Tube (溶出チューブ) (1.5 mL)	50
Buffer G2	2 x 11 mL
Proteinase K	1 x 1.2 mL
Carrier RNA (キャリア RNA)	1 x 310 µg
Q-Card [‡]	1
Quick-Start Protocol (クイックスタートプロトコール)	1

* グアニジン塩を含む。漂白剤を含む消毒剤と一緒に使用できません。安全情報については、6 ページを参照してください。

[‡] Q-Card のバーコードにコード化された情報は、EZ1 Advanced、EZ1 Advanced XL、または EZ2 Connect Fx 装置を使用した試薬のデータトラッキングに必要です。

追加のフィルターチップとチップホルダーは、個別に入手可能です。一部のプロトコールに必要な追加の Buffer G2 は、個別に入手可能です。発注情報については、ページを参照してください。

出荷と保存

EZ1&2 DNA Investigator Kit は、通常の温度で出荷します。バッファーと試薬はすべて、室温（15～25° C）で保存できます。試薬カートリッジを凍結しないでください。適切に保存すれば、試薬カートリッジは、**Q-Card** に記載されている有効期限まで安定しています。凍結乾燥したキャリア RNA は、室温で保存した場合、**Q-Card** に記載されている有効期限まで安定しています。


すぐに使用できる Proteinase K 溶液は、室温で保存した場合、納入後最大 1 年間安定しています。

用途

EZ1&2 DNA Investigator Kit は、法医学、ヒト個人識別、父子鑑定における分子生物学アプリケーション用です。EZ1&2 DNA Investigator Kit は、EZ1 Advanced、BioRobot® EZ1、EZ1 Advanced XL、EZ2 Connect Fx 装置で使用するためのものです。本製品は、疾病の診断、予防、治療を目的としたものではなく、単独でも他の製品との組み合わせでも、そのような用途に対する妥当性は認められていません。本製品の取り扱いには、しかるべき配慮と注意を払う必要があります。当社は **QIAGEN®** 製品のすべてのユーザーに対し、組換え DNA 実験用に作成された NIH ガイドライン、またはその他の該当するガイドラインに従うことを推奨します。

安全情報

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、該当する安全データシート（Safety Data Sheets, SDS）を参照してください。SDS は www.qiagen.com/safety からオンラインで、便利でコンパクトな PDF 形式で入手できます。このサイトで、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、印刷することができます。

<p>注意</p> 	<p>サンプル調製後の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。</p>
---	---

品質管理

EZ1&2 DNA Investigator Kit の各ロットは、QIAGEN の ISO 認証済み品質管理システムに従い、既定の仕様に照らし合わせて検査し、一貫した製品の品質を確保しています。機能的 QC 検査により、EZ1&2 DNA Investigator Kit は、法医学者が求める高い基準を満たしています。EZ1&2 DNA Investigator Kit は、ISO18385 の要件を満たしています。

はじめに

EZ1 装置と EZ1&2 DNA Investigator Kit は、法医学、ヒト個人識別、バイオセキュリティといった用途で遭遇する 1~6 サンプル (EZ1 Advanced および BioRobot EZ1) または 1~14 サンプル (EZ1 Advanced XL) のゲノム DNA の精製を、再現可能な方法で自動化します。精製は効率的であり、精製した DNA は、定量的 PCR や STR 分析などのダウンストリーム分析で優れた性能を発揮し、高い信号対雑音比が得られます。磁性粒子技術により、STR 分析やその他の酵素反応などのダウンストリームアプリケーションに直接使用するのに適した、高品質の DNA が得られます。EZ1 装置は、サンプル調製手順のすべてのステップを実行します。ユーザーはサンプルインプット量を 200 μL と 500 μL から選択できるため、さまざまな量のスタートサンプルからの精製が可能です。1 回のランで、最大 6 個のサンプル (BioRobot EZ1、EZ1 Advanced) または 14 個のサンプル (EZ1 Advanced XL) を処理できます。

EZ1&2 DNA Investigator Kit は、EZ2 Connect Fx 装置にも適合しています。対応するハンドブック「EZ1&2 DNA Investigator Kit ハンドブック — EZ2 Connect Fx を使用した法医学およびヒト ID サンプルからの DNA の自動精製」をご参照ください。

原理と手順

磁性粒子技術は、シリカベースの DNA 精製の速度と効率と、磁性粒子の取り扱いの簡便さを兼ねそろえています (次ページのフローチャート参照)。DNA は、カオトロピック塩の存在下で粒子のシリカ表面に結合することにより、溶解物から 1 ステップで分離されます。磁石を使用して、粒子を溶解物から分離します。その後、DNA を効率的に洗浄し、ユーザーが選択した水または TE バッファーに溶出します。ユーザーは、40 μL (EZ1 Advanced XL のみ)、50 μL 、100 μL 、200 μL の溶出量から選択できます。

EZ1 DNA Investigator 手法

血液または前処理したサンプル



溶解



磁性粒子を
サンプルに添加



DNA が磁性粒子
に結合



磁石

磁気分離



洗浄



磁石

磁気分離



溶出



純粋な高品質 DNA

プロトコルの説明

このハンドブックには、2 種類のプロトコルが記載されています（表 1）。

- 前処理用プロトコルでは、EZ1 装置で処理する前の、Proteinase K 処理などの予備手順について詳しく説明します。
- DNA 精製プロトコルでは、EZ1 装置のセットアップと、完全自動化ランの開始について説明します。

前処理用プロトコル

EZ1&2 DNA Investigator Kit では、処理できるサンプルタイプが幅広いため、特定のサンプルタイプに最適なさまざまな前処理があります。

DNA 精製プロトコル

前処理用プロトコルと組み合わせて使用できる 3 つの DNA 精製プロトコルがあります。各プロトコル内で、ユーザーは溶出を水または TE バッファーから指定でき、溶出量は 40 μL (EZ1 Advanced XL のみ)、50 μL 、100 μL 、200 μL です。この標準プロトコル：DNA 精製(Trace プロトコル)は、すべてのサンプルタイプで使用できます(31 ページ)。

34 ページのプロトコル：DNA 精製（「Tip Dance」プロトコル）では、ピペッティング中にフィルターチップがワークテーブルプラットフォームに対して前後に移動します。これにより、スワブや布地、血液ディスク、たばこの吸い殻などの固形物質をサンプルチューブ内で直接処理できます。通常、事前に遠心分離を行いチップの目詰まりの原因となる固形物質を除去する必要はありません。ただし、脱脂綿などの柔らかいサンプル材料を処理する場合で、予備サンプルを処理できない場合やサンプル材料が貴重な場合は、固形物質の除去を推奨します。

37 ページのプロトコル：DNA 精製（Large-Volume プロトコル）では、最大 500 μL のサンプル量の完全自動処理が可能です。これにより、拡散した染みなどの低濃度 DNA を含む希釈されたサンプルからの効率的な DNA 精製や、完全に溶解するために大量の DNA を必要とするサンプルからの精製が可能です。標準 Trace プロトコルと同じ溶出量で、より多くのサンプル量を処理できるため、高濃縮 DNA の収量が高くなり、ダウンストリームアプリケーションでの感度が向上します。

表 1.さまざまなサンプルタイプのプロトコール情報

サンプルのタイプ	前処理用プロトコール	精製プロトコール	サンプル量	Buffer G2	Proteinase K	DTT 1 mM
血液/唾液	23 ページ	Trace	最大 50 µL	140~190 µL	10 µL	なし
FTA®カード	23 ページ	Trace または Tip Dance	4 x 3 mmパンチ	290 µL	10 µL	なし
表面スワブ	23 ページ	Trace または Tip Dance	1 スワブ	290 µL	10 µL	なし
チューインガム	23 ページ	Trace または Tip Dance	最大 40 mg	190 µL	10 µL	なし
たばこの吸い殻	23 ページ	Trace または Tip Dance	1 cm ²	190 µL	10 µL	なし
紙/類似材料	23 ページ	Trace または Tip Dance	0.5~2.5 cm ²	190 µL	10 µL	なし
爪垢	23 ページ	Trace	最大 40 mg	190 µL	10 µL	なし
切った爪	23 ページ	Trace	1	160 µL	20 µL	20 µL
毛髪	23 ページ	Trace	0.5~1 cm	160 µL	20 µL	20 µL
組織	23 ページ	Trace	最大 10 mg	190 µL	10 µL	なし
血液または唾液の染み	23 ページ	Trace または Tip Dance	0.5 cm ²	290 µL	10 µL	なし
精液の染み	23 ページ	Trace または Tip Dance	0.5 cm ²	270 µL	10 µL	20 µL
大量	23 ページ	Large-Volume	多様	475 µL	25 µL	なし
大量の精液	23 ページ	Large-Volume	多様	455 µL	25 µL	20 µL
性的暴行のサンプル	25 ページ	Trace	多様	最大 2.5 mL*	20 µL	40 µL
骨または歯	27 ページ	Large-Volume	150~200 mg	0.5 M EDTA	25 µL	なし
土壌	29 ページ	Trace または Tip Dance	最大 0.5 g	100 µL	なし	なし

* 精子ペレットの洗浄回数に依存する。

ユーザーが準備する装置と試薬

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。

全プロトコール

- サーモミキサー、ヒートブロック、またはウォーターバス
- ボルテックスミクサー
- ピペットとピペットチップ（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の使用を強く推奨します）

BioRobot EZ1 ユーザー用

- EZ1 DNA Investigator Card（カタログ番号 9016387）

EZ1 Advanced ユーザー用

- EZ1 Advanced DNA Investigator Card（カタログ番号 9018302）

EZ1 Advanced XL ユーザー用

- EZ1 Advanced XL DNA Investigator Card（カタログ番号 9018699）または EZ1 Advanced XL DNA Investigator Flip-Cap Card（カタログ番号 9022763）
- オプション：EZ1 Advanced XL Flip-Cap Tube Rack（カタログ番号 9022818）

EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL ユーザー用

ドキュメンテーションには、次のいずれかが必要です。

- EZ1 Advanced Communicator ソフトウェア（EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL 装置に付属）、PC（最大 4 台の EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL 装置に接続可能）、およびモニター（PC およびモニターのカatalog番号 9016643）

- EZ1 Advanced Communicator ソフトウェア (EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL 装置に付属)、およびお使いの PC とモニター (EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL 装置を最大 4 台接続することは非推奨)

精子細胞が混合した上皮細胞由来 DNA の精製用

- Buffer G2 (カタログ番号 1014636)
- 1 M ジチオスレイトール (DTT)、法医学グレード (カタログ番号 1117316)
- マイクロ遠心機

毛髪由来 DNA の精製用

- 1 M ジチオスレイトール (DTT)、法医学グレード

骨または歯由来 DNA の精製用

- 0.5 M EDTA、pH8.3
- 液体窒素
- 3 M 酢酸ナトリウム (NaOAc)、pH5.0
- Buffer MTL (カタログ番号 19112)
- ピペットチップ (エアロゾルバリア付を推奨)
- 遠心分離機
- サーモキサーまたはオービタルインキュベーター
- TissueLyser II (カタログ番号 85300)、Grinding Jar Set, S. Steel (カタログ番号 69985)、または同等のビーズミル付属

DNA 精製、Large-Volume プロトコール用

- Buffer MTL (54 ml) (カタログ番号 19112)

重要な注意

スタートサンプル

EZ1&2 DNA Investigator で使用するスタートサンプルの量は、サンプル中の DNA 量によって大きく異なります。スタートサンプルの量の具体的な指針を、個々のプロトコールと表 1 に記載しています。EZ1 装置は、DNA 精製用 Trace プロトコール (31 ページ) または「Tip Dance」プロトコール (34 ページ) を使用して、200 μL の前処理済みサンプルを処理できます。Large-Volume プロトコール (37 ページ) では、最大 500 μL の前処理済みサンプルを処理できます。

少量の DNA の精製

少量の血液 (10 μL 未満) や法医学ケースワークサンプルなど、非常に少量のサンプルから DNA を精製するには、キャリア RNA の追加を推奨します。大量の DNA を含むサンプルでは、キャリア RNA の追加はオプションです。凍結乾燥状態のキャリア RNA 310 μg を含むチューブに 310 μL の TE バッファーまたは水を加えて、1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の溶液を調製します。キャリア RNA を完全に溶解し、使いやすいように小分けして -30~-15° C で保存します。小分けしたキャリア RNA の凍結融解は 3 回までとしてください。分解を避けるため、キャリア RNA は完全に溶解してからサンプルに追加する必要があります。Large-Volume プロトコールを使用する場合は、装置のランを設定する前に、キャリア RNA を Buffer MTL に追加できます。MTL とキャリア RNA の混合物は同日中に使用してください。

EZ1 装置の操作

EZ1 装置の主な特長：

- 1 回のランで 1~6 サンプルまたは 1~14 サンプルから高品質の核酸を精製
- 実験室のスペースを節約できるわずかな設置面積
- 核酸精製にすぐに使用できるプロトコルを備えた、プログラム済み EZ1 Card
- 充填済み密封試薬カートリッジで EZ1 装置を簡単、安全、迅速にセットアップ
- 試薬カートリッジ開封から核酸溶出まで、核酸精製を完全自動化。手動での遠心分離ステップは不要

EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL の追加機能：

- バーコード読み取りとサンプルトラッキング
- キット付属の Q-Card を使用したキットデータトラッキング
- ラン間のサンプルキャリーオーバーを排除し、ワークテーブル表面の病原体除去を可能にする UV ランプ

注記：UV 除染は、EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL ワークテーブル表面の病原体汚染の抑制に役立ちます。不活性化の効率は、個別の生物体ごとに決定する必要があります。たとえば層厚やサンプルタイプにより異なります。QIAGEN では、特定の病原体の完全な除去を保証することはできません。

EZ1 Card、EZ1 Advanced Card、EZ1 Advanced XL Card

核酸精製プロトコルは、プログラム済み EZ1 Card (IC カード) に保存されています。ユーザーは、EZ1 Advanced XL Card を EZ1 Advanced XL に、EZ1 Advanced Card を EZ1 Advanced に、あるいは EZ1 Card を BioRobot EZ1 に挿入するだけです。挿入すると、プロトコルをランする準備が整います (図 1 参照)。さまざまなプロトコルを使用できるため、EZ1 装置は高い柔軟性を備えています。なお、Flip-Cap Tube Rack は、EZ1 ADV XL の EZ1 DNA Investigator Flip-Cap Card でしか使用できないことにご注意ください。



図 1. EZ1 Card を使用した簡便なプロトコール設定。 プロトコールが保存された EZ1 Card を EZ1 装置に挿入。装置の電源は必ず、EZ1 Card 挿入後に入れる必要があります。装置の電源が入った状態で、EZ1 Card を交換しないでください。

EZ1&2 DNA Investigator Kit は、EZ1 Advanced XL と EZ1 Advanced XL DNA Investigator Card、EZ1 Advanced と EZ1 Advanced DNA Investigator Card、または BioRobot EZ1 と EZ1 DNA Investigator Card の組み合わせで使用する必要があります。この EZ1 Card は、法医学サンプルやヒト個人識別サンプルから DNA を精製するプロトコールを備えています。

EZ1 装置の電源は必ず、EZ1 Card 挿入後に入れる必要があります。EZ1 Card が完全に挿入されていることを確認してください（図 2 参照）。そうでない場合、重要な装置データが失われ、メモリエラーが発生する恐れがあります。装置の電源が入った状態で、EZ1 Card を交換しないでください。



図 2. EZ1 Card を完全に挿入。 EZ1 Card を完全に挿入してから EZ1 装置の電源を入れてください。

試薬カートリッジ

単一サンプルから核酸を精製するための試薬は、単一試薬カートリッジに含まれています（図 3 参照）。カートリッジの各ウェルには、磁性粒子、溶解バッファー、洗浄バッファー、溶出バッファーなどの特定の試薬が含まれています。各ウェルには必要量の試薬しか含まれていないため、精製手順の最後に試薬が残り、廃棄物が発生することはありません。

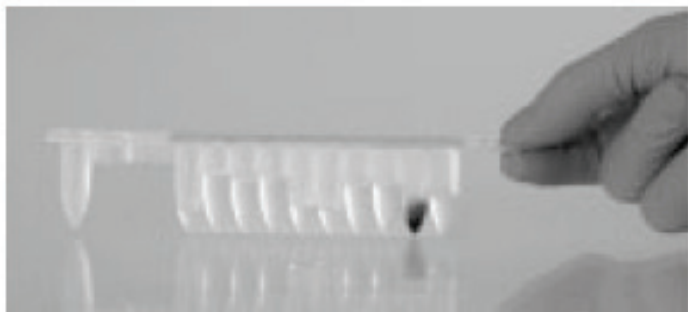
A**B**

図 3. 試薬カートリッジを使用した簡便なセットアップ。 (A) 密封した充填済み試薬カートリッジ。充填レベルは、試薬カートリッジのタイプによって異なります。(B) 試薬カートリッジをカートリッジラックにセットします。カートリッジラック自体には、試薬カートリッジをセットする方向を示した矢印のラベルが付いています。

ワークテーブル

EZ1 装置のワークテーブルは、ユーザーがサンプルや EZ1&2 DNA Investigator Kit のコンポーネントをセットする場所です（図 4 参照）。EZ1 Advanced XL では、2 つのサンプルラックがあります。EZ1&2 DNA Investigator Kit に付属のスクリュューキャップサンプルと溶出チューブを使用する標準ラックと、スクリュューキャップとフリップキャップチューブの両方を使用できる Flip-Cap Tube Rack です。Flip-Cap Tube Rack は、EZ1 DNA Investigator Flip-Cap Card でしか使用できないことにご注意ください。ワークテーブルのセットアップの詳細は、このハンドブックのプロトコールに記載されているほか、ディスプレイには、自動精製手順中のプロトコールステータスが表示されます。



図 4. 一般的な EZ1 ワークテーブル

1. 一列目：ここに溶出チューブ（1.5mL）をセットする。

2. 二列目：フィルターチップを含むホルダーをここにセットする。
3. 三列目：フィルターチップを含むホルダーをここにセットする。（一部のプロトコールでは、この列は空とするか、2 mL の Sarstedt チューブをセットする）。
4. 四列目：サンプルチューブ（2 mL）をここにセットする。
5. 試薬カートリッジをカートリッジラックにセットする。
6. 溶解用試薬カートリッジに 2 mL のチューブが入ったヒートブロック。

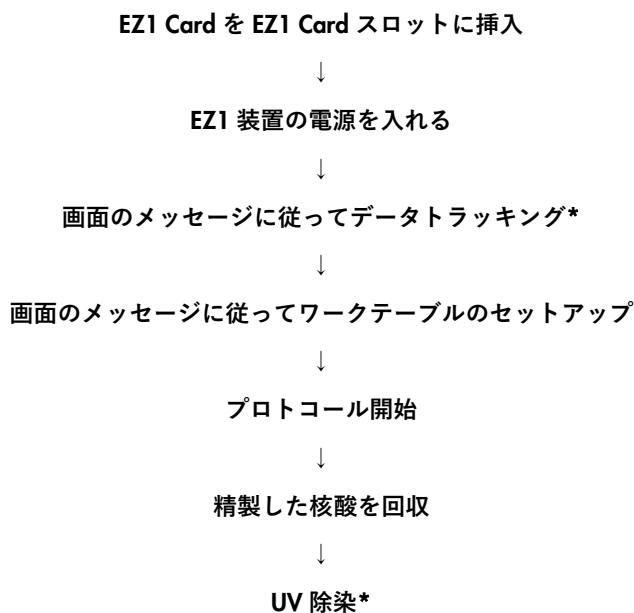
EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL を使用したデータトラッキング

EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL は、さまざまなデータの完全なトラッキングが可能のため、プロセスコントロールと信頼性が向上します。プロトコール開始時に、Q-Card バーコードを使用して、EZ1&2 Kit のロット番号と有効期限を入力します。ユーザーID と Q-Card バーコードは、キーパッドを使って手動で入力するか、ハンドヘルドバーコードリーダーを使用してバーコードをスキャンして入力できます。サンプルおよびアッセイ情報も、プロトコール開始時にオプションで入力できます。プロトコールのランが終了すると、レポートファイルが自動作成されます。EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL は、最大 10 個の結果ファイルを保存できます。データは PC に転送するか、プリンターで直接印刷できます（オーダーインフォメーションについては、11 ページの「ユーザーが準備する装置と試薬」参照）。

PC でレポートファイルを受信するには、EZ1 Advanced Communicator ソフトウェアをインストールする必要があります。このソフトウェアでレポートファイルを受け取り、ユーザーが指定したフォルダーに保存します。PC がレポートファイルを受信したら、LIMS（実験室情報管理システム：Laboratory Information Management System）または他のプログラムでファイルを使用および処理できます。レポートファイルの例を付録 A（43 ページ）に示します。レポートファイルでは、EZ1 Advanced の 6 つのピペッティングチャンネルに、左から右へチャンネル A～F と名付けます。EZ1 Advanced XL の 14 個のピペッティングチャンネルには、左から右へチャンネル 1～14 と名付けます。バーコードリーダーでユーザーID または Q-Card のバーコードをスキャンすると、ビーブ音でデータ入力を確認します。情報は、2 秒間表示された後に自動保存され、次のディスプレイメッセージが表示されます。サンプル ID、アッセイキット ID、または注記をスキャンすると、ビーブ音でデータ入力を確認し、情報が表示され、次の情報項目の入力を求めるメッセージが表示されます。サンプル ID、アッセイキット ID、および注記をスキャン後、「ENT」を 1 回押して、入力した情報が正しいことを確認します。

たとえば、サンプルの 1 つで間違っただけのバーコードをスキャンした場合は、「ESC」を押してから、画面の指示に従ってすべてのサンプルバーコードを再スキャンします。ユーザーID と注記については、キーパッドを使用して番号を入力できます。あるいは、お客様自身のバーコードを容易に生成し、この番号をコード化できます。データトラッキングと EZ1 Advanced Communicator ソフトウェアの使用に関する詳細については、*EZ1 Advanced ユーザー マニュアル*または *EZ1 Advanced XL ユーザー マニュアル*をご参照ください。

EZ1 操作のワークフロー



* EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL のみ。

精製 DNA の収量

DNA の収量は、サンプルタイプ、サンプル中の有核細胞の数、DNA 精製に使用するプロトコールによって異なります。表 2 に、いくつかの一般的なリファレンスサンプルタイプの典型的な収量を示します。

表 2. EZ1 DNA Investigator 手法を使用した一般的なリファレンスサンプルタイプの DNA 収量

サンプルタイプ	サンプル量	プロトコール	DNA 収量
血液*	10~200 μ L	Trace または Tip Dance	150 ng~2 μ g
乾燥血液	4 x 3 mm ディスク	Tip Dance	0.2~0.5 μ g
口腔細胞	1 スワブ	Tip Dance	100 ng~2 μ g

* 3~7 x10⁶ 白血球/mL を含む全血。溶出量 200 μ L。

試薬カートリッジ中の沈殿物

試薬カートリッジのウェル 1（試薬カートリッジをセットした際に EZ1 装置の前面に最も近いウェル）中のバッファーは、保存時に沈殿物を形成する可能性があります。必要に応じて、37° C で穏やかに攪拌して再溶解し、室温（15~25° C）の環境に置いてください。

試薬カートリッジの均一化

試薬カートリッジを 2~8° C で保存した場合は、使用前に操作温度に戻す必要があります。試薬カートリッジをシェーカーインキュベーターに入れ、使用前に少なくとも 2 時間、穏やかに攪拌しながら 30~40°C でインキュベートします。ウェルの底に沈殿物が見える場合は、30~40° C で穏やかに攪拌しながらさらに 2 時間インキュベートして、再溶解します。沈殿物が再溶解しない場合は、試薬カートリッジを使用しないでください。

Proteinase K による溶解

EZ1&2 DNA Investigator Kit には、EZ1 DNA Investigator プロトコールで使用する溶解バッファーに最適な酵素である Proteinase K が含まれています。Proteinase K はピキア・パストリスで発現する組換えタンパク質であり、処理時間が短い場合に特に適しています。比活性が高く、広範囲の温度と pH 値で安定性を示し、高温で活性が大幅に増大します。Proteinase K 溶液の活性は、600 mAU/mL 溶液（または 40 mAU/mg タンパク質）です。この活性により、EZ1 DNA Investigator プロトコールで最適な結果が得られます。

DNA の定量

法医学ケースワークやその他のヒト個人識別検査の用途では、DNA は分解、阻害、または混合されていることが一般的です。このようなサンプルは、STR 分析では課題が生じることがあります。リアルタイム PCR を使用して、精製 DNA の事前定量を行うことが推奨されます。これにより、ダウンストリーム分析を繰り返す必要性が下がり、コストと時間を大幅に削減でき、結果の統計的妥当性が向上します。Investigator Quantiplex™ Kit は、定量的リアルタイム PCR を使用して、サンプル中のヒトのトータル DNA とヒト男性の DNA を定量します。このキットは、サンプルにダウンストリームアプリケーションを妨害する可能性のある阻害物質が含まれているかどうか、または DNA が分解されているかどうかを検出します。

プロトコール：各種ケースワークおよびリファレンスサンプルの前処理

このプロトコールは、各種タイプのケースワークおよびリファレンスサンプルからトータル DNA（ゲノムおよびミトコンドリア）を分離するためのものです。このプロトコールでは、Proteinase K を使用した予備溶解について説明します。

開始する前の重要な留意点

- 作業を始める前に、13 ページの「重要な注意」をよくお読みください。
- 固体サンプル材料を溶解物から除去する必要がある場合は、Investigator Lyse&Spin Basket Kit (カタログ番号 19597 または 19598) の使用を推奨します。このキットを使用する場合は、対応するハンドブックに記載されている前処理用プロトコールおよび DNA 精製用 Large-Volume プロトコールに従ってください。Lyse&Spin Basket Kit 採取チューブは、Flip-Cap Tube Rack(カタログ番号 9022818)および Flip-Cap Card(カタログ番号 9022763) を使用して、EZ1 Advanced XL のサンプルチューブとして使用できます。

開始する前に

- ステップ3 の Proteinase K 処理用に、サーモミキサー、ヒートブロック、またはウォーターバスを 56° C に加温します。

操作手順

1. サンプルを 2 mL のサンプルチューブに移す。
2. 10 ページの表 1 に記載する情報に従って、Proteinase K 処理を設定する。10 秒間ボルテックスし、サンプルを完全に混和する。
3. 900 rpm で振とうするサーモミキサーで、56°C で 15 分から一晩にわたりにンキュベートする。

DAN を大量に含むサンプルから STR タイピングに十分な DNA を回収する場合、15 分で十分な場合があります。DNA が少量と予想される場合は、1 時間以上インキュベートすることを推奨します。

4. 必要に応じて、チューブを指先で軽くたたいて蓋の内側から水滴を取り除く。
オプション：キャリア RNA 1 μg を追加する（13 ページの「重要な注意」を参照）。
5. 次のいずれかのオプションを使用して、引き続き「プロトコール：DNA 精製」を実行する。
 - 5a. 31 ページの Trace プロトコール。
固形物を含まないサンプルの場合。溶解物の量は約 200 μL としてください。
 - 5b. 34 ページの「Tip Dance」プロトコール。
「Tip Dance」プロトコールを使用する場合、通常、チューブから固形物を取り除く必要はありません。ただし、脱脂綿などの柔らかいサンプル材料を処理する場合で、予備サンプルを処理できない場合やサンプル材料が貴重な場合は、固形物の除去を推奨します。「Tip Dance」プロトコールでは、サンプル基質（スワブや布地片など）に吸収された溶解物は回収されないため、溶解物を完全に回収する方法と比較して、感度がやや低下すると予想されることにご注意ください。感度を最大限に高めるため、Investigator Lyse&Spin Basket Kit の使用を推奨します。
 - 5c. 37 ページの Large-Volume プロトコール。
Large-Volume プロトコールは、500 μL の溶解物から DNA を精製します。

プロトコール：精子細胞が混合した上皮細胞の前処理

このプロトコールは、精子細胞が混合した上皮細胞からトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNAを精製するためのものです。このプロトコールでは、Proteinase Kとジチオスレイトール（DTT）を使用したサンプルの予備溶解について説明します。

開始する前の重要な留意点

- 作業を始める前に、13ページの「重要な注意」をよくお読みください。
- 一部のサンプルタイプ（布地など）は吸収性が非常に高い傾向があるため、ステップ2でサンプルに処理バッファーを多めに追加する必要がある場合があります。

開始する前に

- Proteinase K 処理用のサーモミキサー、ヒートブロック、またはウォーターバスをステップ4で56° Cに、ステップ12で70° Cに加熱します。

操作手順

1. 法医学サンプルを1.5 mLまたは2 mLのサンプルチューブに入れる。
2. サンプルに190 μ LのBuffer G2を加える。
3. 10 μ LのProteinase Kを加え、10秒間ボルテックスして完全に混和する。
4. 56° Cで1~2時間インキュベートする。2時間を超えないこと。
インキュベーション中にチューブを1~2回ボルテックスするか、サーモミキサーに入れる。
5. チューブを短時間遠心分離して、蓋の内側から水滴を取り除く。
6. チューブから固形物質をすべて取り除く。
7. チューブを15,000 x gで5分間遠心分離する。精子細胞ペレットを乱さないように気を付けながら、上清を新しいチューブに慎重に移す。

上皮細胞由来の DNA は、31 ページのプロトコール：DNA 精製 (Trace プロトコール) に従って、または上皮細胞画分が非常に希薄な場合は、37 ページのプロトコール：DNA 精製 (Large-Volume プロトコール) に従って、上清を含むチューブから精製できます。

注記：細胞ペレットが見えないことがあります

8. ペレットを 500 μL の Buffer G2 に再懸濁して、精子細胞ペレットを洗浄する。チューブを 15,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を廃棄する。
9. ステップ8 を 2、3 回繰り返す。
10. 160 μL の Buffer G2 をペレットに加え、ペレットを再懸濁する。
11. 10 μL の Proteinase K と 40 μL の 1M DTT を加え、10 秒間ボルテックスして完全に混和する。
12. シェーカーインキュベーターまたはサーモミキサーで、70° C、850 rpm で 10 分間インキュベートする。
最大限の回収率を得るには、サンプルをウルトラソニケーターに 10 分間入れるか、10 秒間激しくボルテックスします。
13. チューブを短時間遠心分離して、蓋の内側から水滴を取り除く。これで、精子細胞由来の DNA をこのチューブから精製できる。
14. 引き続き 31 ページのプロトコール：DNA 精製 (Trace プロトコール) を行う。
上皮細胞と精子細胞が別々に入った 2 本のチューブを DNA 精製に使用できるようになります。

プロトコール：骨または歯からの DNA の抽出

このプロトコールは、EZ1&2 DNA Investigator Kit と EZ1 Advanced または EZ1 Advanced XL を使用して、骨および歯のサンプルから阻害物質を含まない DNA を効率的に回収するためのものです。EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL は、キットのハンドブックに記載されている用途について、これらの装置と使用するよう指示されている QIAGEN キットと組み合わせてのみ使用することを目的としています。

開始する前の重要な留意点

- EZ1&2 DNA Investigator Kit をはじめて使用するときは、「重要な注意」をよくお読みください。
- このプロトコールには酢酸ナトリウム (NaOAc) が必要ですが、EZ1&2 DNA Investigator Kit には含まれていません。NaOAc は、別途購入する必要があります。
- このプロトコールには EDTA が必要ですが、EZ1&2 DNA Investigator Kit には含まれていません。EDTA は、別途購入する必要があります。
- このプロトコールと、サンプル処理の完了に使用する Large-Volume EZ1 プロトコールには、Buffer MTL が必要です。Buffer MTL は EZ1&2 DNA Investigator Kit に含まれていないため、別途購入する必要があります (カタログ番号 1023430)。

開始する前に

- ステップ7の Proteinase K の処理のため、サーマルミキサーまたはオービタルインキュベーターを 56° C に加温します。

操作手順

1. 骨や歯の表面を取り除き、廃棄する。残った骨や歯根を微粉末に粉砕する。

注記：液体窒素を半分充填した金属ブレンダーを使用して粉砕します。または、TissueLyser II と Grinding Jar Set, S.Steel を使用して粉砕します。TissueLyser II 装置は EZ1&2 DNA Investigator Kit に含まれていないため、別途購入する必要があります (カタログ番号 85300)。

注記：TissueLyser II を使用する場合は、骨または歯のサンプルとボールを粉砕ジャーに移し、粉砕ジャーの中のボールと、骨または歯断片の上に液体窒素を注ぎます。温度が平衡になるまで待ちます (液体窒素の沸騰が止まる)。デカンテーションにより過剰な

液体窒素を廃棄し、粉碎ジャーの蓋を閉め、TissueLyser II にセットします。骨を 30 Hz で 1 分間、あるいは骨が粉末になるまで粉碎します（粉碎時間はサンプルのタイプ、状態、大きさにより異なる）。

2. 最大 150 mg の粉末骨を 2 mL のサンプルチューブに入れる。骨粉の量を超えないこと。多くの総収量が必要な場合は、追加の抽出物を処理し、溶出液をプールして濃縮することを推奨する。
3. 225 μ L の Buffer G2 を追加する。
4. 25 μ L の Proteinase K を追加する。
5. pH8.0、250 μ L の 0.5M EDTA を追加する。
6. 2 mL チューブを数回反転させて混和する。
7. チューブをサーマルミキサーまたは加熱オービタルインキュベーターに入れ、56°C で 24 時間一定の動きでインキュベートする。
8. 6000 rpm で 4 分間遠心分離し、残存する破片をペレット化する。上清を EZ1 サンプルチューブに移す。
9. 各 2 mL EZ1 サンプルチューブに 400 μ L の Buffer MTL を追加する。
10. 各 2 mL EZ1 サンプルチューブに pH5.0、50 μ L の 3M NaOAc を追加する。
11. 各 2 mL EZ1 サンプルチューブに 1 μ L のキャリア RNA を加える。
注記： Buffer MTL、NaOAc、キャリア RNA のマスターミックスを調製し、同日中に使用できます。
12. 引き続き 37 ページのプロトコール：DNA 精製 (Large-Volume プロトコール) を行う。

プロトコール：土壌の前処理

このプロトコールは、土壌からトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA を分離するためのものです。このプロトコールでは、InhibitEX®タブレットを使用した土壌サンプルの予備溶解と阻害物質の吸着について説明します（QIAGEN テクニカルサービスにご連絡ください。裏表紙参照）。

スタートサンプル

土壌のタイプにもよりますが、最大 0.5 g の土壌を使用できます。綿状の土壌サンプルでは、使用するスタートサンプルを少なくする必要があります。

開始する前の重要な留意点

- 作業を始める前に、13 ページの「重要な注意」をよくお読みください。
- このプロトコールでは、Proteinase K は不要です。
- このプロトコールには InhibitEX タブレットが必要です（QIAGEN テクニカルサービスにご連絡ください。裏表紙参照）。

開始する前に

- ステップ2 で使用するサーモミキサー、ヒートブロック、またはウォーターバスを 95° C に加熱します。

操作手順

1. 土壌サンプルを 2 mL のサンプルチューブに入れる。
2. 蒸留水 900 μ L を追加する。ボルテックスして土壌を再懸濁し、95° C で 10 分間インキュベートする。
3. チューブを 4000 x g で 10 分間遠心分離する。上清を別の 2 mL サンプルチューブに移し、190 μ L の Buffer G2 を加える。ボルテックスして混和する。
4. InhibitEX タブレットを 1 つ追加し、室温（15~25° C）で 1 分間インキュベートする。

-
5. ボルテックスして混合し、 $10,000 \times g$ で 2 分間遠心分離する。プロトコール：DNA 精製 (Trace プロトコール) に進む場合は、上清 $200 \mu\text{L}$ を EZ1 サンプルチューブに移す。プロトコール：DNA 精製 (Large-Volume プロトコール) に進む場合は、上清 $500 \mu\text{L}$ を EZ1 サンプルチューブに移す。
 6. 引き続き 31 ページのプロトコール：DNA 精製 (Trace プロトコール)、または 37 ページのプロトコール：DNA 精製 (Large-Volume プロトコール) を行う。

プロトコール：DNA 精製 (Trace プロトコール)

このプロトコールは、このハンドブック (23~29 ページ) の関連プロトコールに記載の通りに前処理した法医学サンプルからトータル (ゲノムおよびミトコンドリア) DNA を分離するためのものです。このプロトコールでは、EZ1 装置をセットアップし、ランを開始するための簡単な手順を説明します。

開始する前の重要な留意点

- EZ1&2 DNA Investigator Kit をはじめて使用するときは、「重要な注意」 (13 ページ) をよくお読みください。
- 試薬カートリッジにはグアニジン塩が含まれるため、漂白剤を含む消毒剤とは併用できません。安全情報については、6 ページを参照してください。
- プロトコールのすべてのステップは、室温 (15~25° C)で行ってください。セットアップ手順中は、すばやく作業してください。
- 手順の一部のステップでは、2つの選択肢のうち1つを選択できます。EZ1 Advanced または EZ1 Advanced XL を使用する場合は ▲ を選択します。BioRobot EZ1 を使用する場合は ● を選択します。

開始する前に

- 試薬カートリッジを 2~8° C で保存していた場合は、使用前に操作温度に戻します。21 ページの「試薬カートリッジの平衡化」を参照してください。
- サンプルチューブからあらゆる固形物質を取り除きます。
- 試薬カートリッジ内の溶解バッファーは、保存中に沈殿物を形成する可能性があります。必要に応じて、37° C で加温して再溶解し、室温 (15~25° C) の環境に置いてください。

操作手順

1. ▲ EZ1 Advanced DNA Investigator Card を EZ1 Advanced の EZ1 Advanced Card スロットに、EZ1 Advanced XL DNA Investigator Card を EZ1 Advanced XL の EZ1 Advanced XL Card スロットに、あるいは ● EZ1 DNA Investigator Card を BioRobot EZ1 の EZ1 Card スロットに完全に挿入する。
2. EZ1 装置の電源を入れる。
3. 「START (スタート)」を押してプロトコールのセットアップを開始する。▲ 画面の指示に従って、データをトラッキングする。
4. 「1」を押す (Trace プロトコールの場合)。
5. 溶出バッファーと溶出量を選択する：水で溶出する場合は「1」、TE バッファーで溶出する場合は「2」を押す。次に、「1」、「2」、「3」(または「4」、EZ1 Advanced XL のみ)を押して、溶出量を選択する。
6. いずれかのキーを押してディスプレイ上に表示されたテキストに進み、ワークテーブルのセットアップを開始する。

このテキストは、ワークテーブルへの試薬のセットの仕方を要約したものです。必要なアイテムをワークテーブルにセットする際は手袋を着用してください。
7. 装置のドアを開ける。
8. 試薬カートリッジを 2 回反転させて、磁性粒子を混和する。次に、カートリッジを軽くたたいて、ウェルの底に試薬を回収する。磁性粒子が完全に再懸濁していることを確認する。
9. 試薬カートリッジをカートリッジラックにセットする。

注記：試薬カートリッジをカートリッジラックに差し込んだ後、カチッという音がするまでカートリッジを確実に押し込んでください。
10. チップラックの二列目に、蓋を開けた溶出チューブをセットする。
11. チップラックの二列目に、フィルターチップの入ったチップホルダーをセットする。
12. チップラックの後列に、処理済みサンプルが入った蓋を開けたサンプルチューブをセットする。

このハンドブックの個々のプロトコールに従って、サンプルを前処理します。

注記：データトラッキングオプションを使用する場合は、データの混同を避けるため、サンプル ID がワークテーブルのサンプルと同じ順序になるようにします。
13. 装置のドアを閉める。
14. 「START (スタート)」を押して、精製手順を開始します。

自動精製手順には 15～20 分かかります。

15. プロトコールが終了すると、ディスプレイに「Protocol finished (プロトコール終了)」と表示される。▲ 「ENT」を押してレポートファイルを作成する。

EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL は、最大 10 個のレポートファイルを保存できます。レポートファイルは、接続しているプリンターで直接印刷することも、パソコンに転送することもできます。

16. 装置のドアを開ける。
17. 精製済み DNA を含む溶出チューブを回収する。DNA 溶液はすぐに使用できるほか、2～8° C で 24 時間、-30～-15° C ではさらに長期間保存可能。廃液を含む使用済みカートリッジを廃棄する。*

精製済み DNA をリアルタイム PCR で分析する場合は、磁性粒子のキャリーオーバーのリスクを最小限に抑えるために、溶出液を含むチューブを最初に適切な磁性分離器に適用し、溶出液を清浄なチューブに移す必要があります。

18. ▲ オプション：画面の指示に従って、ワークテーブル表面の UV 除染を実行します。
19. 別のプロトコールをランするには、「ESC」を押し、関連するプロトコールの説明に従ってサンプルを調製し、ステップ4以降の手順に従う。もしくは、「STOP (ストップ)」を 2 回押してディスプレイの最初の画面に戻り、装置のドアを閉めて、EZ1 装置の電源を切る。

20. EZ1 装置を清掃する。
お使いの EZ1 装置に付属するユーザーマニュアルに記載されているメンテナンス手順に従ってください。

* サンプル廃液はグアニジン塩を含むため、漂白剤と共用できません。安全情報については、6 ページを参照してください。

プロトコール：DNA 精製（「Tip Dance」プロトコール）

このプロトコールは、このハンドブック（23～29 ページ）の関連プロトコールに記載の通りに前処理した法医学サンプルからトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA を分離するためのものです。このプロトコールでは、EZ1 装置をセットアップしてランを開始するための簡単な手法を説明します。「Tip Dance」プロトコールでは、フィルターチップがピペティング中にワークテーブルプラットフォームに対して前後に移動します。これにより、スワブ、布地、血液ディスク、たばこの吸い殻などの固形物質をサンプルチューブ内で直接処理できます。通常、事前に遠心分離を行いチップの目詰まりの原因となる固形物質を除去する必要はありません。ただし、脱脂綿などの柔らかいサンプル材料を処理する場合で、予備サンプルを処理できない場合やサンプル材料が貴重な場合は、固形物を取り除くことを推奨します。

開始する前の重要な留意点

- EZ1&2 DNA Investigator Kit をはじめて使用するときは、「重要な注意」（13 ページ）をよくお読みください。
- 試薬カートリッジにはグアニジン塩が含まれるため、漂白剤を含む消毒剤とは併用できません。安全情報については、6 ページを参照してください。
- プロトコールのすべてのステップは、室温（15～25° C）で行ってください。セットアップ手順中は、すばやく作業してください。
- 手順の一部のステップでは、2 つの選択肢のうち 1 つを選択できます。EZ1 Advanced または EZ1 Advanced XL を使用する場合は ▲ を選択します。BioRobot EZ1 を使用する場合は ● を選択します。

開始する前に

- 試薬カートリッジを 2～8° C で保存していた場合は、使用前に操作温度に戻します。21 ページの「試薬カートリッジの均一化」を参照してください。

- 試薬カートリッジ内の溶解バッファーは、保存中に沈殿物を形成する可能性があります。必要に応じて、37° C で加温して再溶解し、室温（15～25° C）の環境に置いてください。

操作手順

1. ▲ EZ1 Advanced DNA Investigator Card を EZ1 Advanced の EZ1 Advanced Card スロットに、EZ1 Advanced XL DNA Investigator Card を EZ1 Advanced XL の EZ1 Advanced XL Card スロットに、あるいは ● EZ1 DNA Investigator Card を BioRobot EZ1 の EZ1 Card スロットに完全に挿入する。
2. EZ1 装置の電源を入れる。
3. 「START（スタート）」を押してプロトコルのセットアップを開始する。▲ 画面の指示に従って、データをトラッキングする。
4. 「2」を押す（Trace TD プロトコル）。
5. 溶出バッファーと容量を選択する：水で溶出する場合は「1」、TE で溶出する場合は「2」を押す。次に、「1」、「2」、「3」（または「4」、EZ1 Advanced XL のみ）を押して、溶出量を選択する。
6. いずれかのキーを押してディスプレイ上に表示されたテキストに進み、ワークテーブルのセットアップを開始する。

このテキストは、ワークテーブルへの試薬のセットの仕方を要約したものです。必要なアイテムをワークテーブルにセットする際は手袋を着用してください。
7. 装置のドアを開ける。
8. 試薬カートリッジを 2 回反転させて、磁性粒子を混和する。次に、カートリッジを軽くたたき、ウェルの底に試薬を回収する。磁性粒子が完全に再懸濁していることを確認する。
9. 試薬カートリッジをカートリッジラックにセットする。

注記：試薬カートリッジをカートリッジラックに差し込んだ後、カチッという音がするまでカートリッジを確実に押し込んでください。
10. チップラックの二列目に蓋を開けた溶出チューブをセットする。
11. チップラックの二列目にフィルターチップの入ったチップホルダーをセットする。

12. チップラックの後列に、処理済みサンプルが入った蓋を開けたサンプルチューブをセットする。

このハンドブックの個々のプロトコールに従ってサンプルを前処理します。

注記: データトラッキングオプションを使用する場合は、データの混同を避けるために、サンプル ID がワークテーブルのサンプルと同じ順序になるようにします。

13. 装置のドアを閉める。
14. 「START (スタート)」を押して、精製手順を開始する。
自動精製手順には 15~20 分かかります。
15. プロトコールが終了すると、ディスプレイに「Protocol finished (プロトコール終了)」と表示される。▲ 「ENT」を押してレポートファイルを作成する。

EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL は、最大 10 個のレポートファイルを保存できます。レポートファイルは、接続しているプリンターで直接印刷することも、パソコンに転送することもできます。

16. 装置のドアを開ける。
17. 精製済み DNA を含む溶出チューブを回収する。DNA 溶液はすぐに使用できるほか、2~8° C で 24 時間、-30~-15° C ではさらに長期間保存可能。サンプル調製廃棄物を廃棄する。

精製済み DNA をリアルタイム PCR で分析する場合は、磁性粒子のキャリーオーバーのリスクを最小限に抑えるために、溶出液を含むチューブを最初に適切な磁性分離器に適用し、溶出液を清浄なチューブに移す必要があります。

18. ▲ オプション：画面の指示に従って、ワークテーブル表面の UV 除染を実行する。
19. 別のプロトコールをランするには、「ESC」を押し、関連するプロトコールの説明に従ってサンプルを調製し、ステップ4以降の手順に従う。もしくは、「STOP (ストップ)」を 2 回押してディスプレイの最初の画面に戻り、装置のドアを閉めて、EZ1 装置の電源を切る。

20. EZ1 装置を清掃する。

お使いの EZ1 装置に付属するユーザーマニュアルに記載されているメンテナンス手順に従ってください。

プロトコール：DNA 精製 (Large-Volume プロトコール)

このプロトコールは、このハンドブック (23~29 ページ) の関連プロトコールに記載の通りに前処理した法医学サンプルからトータル (ゲノムおよびミトコンドリア) DNA を分離するためのものです。このプロトコールでは、EZ1 装置をセットアップしてランを開始するための簡単な手法を説明します。

スタートサンプル

このプロトコールを使用すると、最大 500 μ L の前処理済みサンプルを処理できます。これにより、拡散した染みなどの低濃度の DNA を含む希釈サンプルからの効率的な DNA 精製が可能になるだけでなく、完全に溶解させるために大量の DNA を必要とするサンプルからの精製も可能になります。標準 Trace プロトコールと同じ溶出量で、多くのサンプル量を処理できるため、高濃縮 DNA の収量が高くなり、ダウンストリームアプリケーションでの感度が向上します。

開始する前の重要な留意点

- EZ1&2 DNA Investigator Kit をはじめて使用するときは、「重要な注意」 (13 ページ) をよくお読みください。
- 試薬カートリッジにはグアニジン塩が含まれるため、漂白剤を含む消毒剤とは併用できません。安全情報については、6 ページを参照してください。
- プロトコールのすべてのステップは、室温 (15~25° C)で行ってください。セットアップ手順中は、すばやく作業してください。
- このプロトコールには、追加の Buffer MTL (カタログ番号 19112) が必要です。
- 手順の一部のステップでは、2 つの選択肢のうち 1 つを選択できます。EZ1 Advanced または EZ1 Advanced XL を使用する場合は ▲ を選択します。BioRobot EZ1 を使用する場合は ● を選択します。

開始する前に

- 試薬カートリッジを 2~8° C で保存していた場合は、使用前に操作温度に戻します。
21 ページの「試薬カートリッジの均一化」を参照してください。
- サンプルチューブからあらゆる固形物質を取り除きます。
- 試薬カートリッジ内の溶解バッファーは、保存中に沈殿物を形成する可能性があります。
必要に応じて、37° C で加温して再溶解し、室温（15~25° C）の環境に置いてください。

操作手順

1. ▲ EZ1 Advanced DNA Investigator Card を EZ1 Advanced の EZ1 Advanced Card スロットに、EZ1 Advanced XL DNA Investigator Card を EZ1 Advanced XL の EZ1 Advanced XL Card スロットに、あるいは ● EZ1 DNA Investigator Card を BioRobot EZ1 の EZ1 Card スロットに完全に挿入する。
2. EZ1 装置の電源を入れる。
3. 「START（スタート）」を押してプロトコールのセットアップを開始する。▲ 画面の指示に従って、データをトラッキングする。
4. 「3」を押す（Large-Volume プロトコールの場合）。
5. 溶出バッファーと溶出量を選択する：水で溶出する場合は「1」、TE バッファーで溶出する場合は「2」を押す。次に、「1」、「2」、「3」（または「4」、EZ1 Advanced XL のみ）を押して、溶出量を選択する。
6. いずれかのキーを押してディスプレイ上に表示されたテキストに進み、ワークテーブルのセットアップを開始する。

このテキストは、ワークテーブルへの試薬のセットの仕方を要約したものです。必要なアイテムをワークテーブルにセットする際は手袋を着用してください。
7. 装置のドアを開ける。
8. 試薬カートリッジを 2 回反転させて、磁性粒子を混和する。次に、カートリッジを軽くたたいて、ウェルの底に試薬を回収する。磁性粒子が完全に再懸濁していることを確認する。

9. 試薬カートリッジをカートリッジラックにセットする。

注記：試薬カートリッジをカートリッジラックに差し込んだ後、カチッという音がするまでカートリッジを確実に押し込んでください。

10. チップラックの第一列目に蓋を開けた溶出チューブをセットする。

11. チップラックの第二列目にフィルターチップの入ったチップホルダーをセットする。

12. 処理済みサンプルが入った各サンプルチューブに 400 μ L の Buffer MTL を追加する。チップラックの後列に、Buffer MTL と処理済みサンプルが入った蓋を開けたサンプルチューブをセットする。

このハンドブックの個々のプロトコールに従ってサンプルを前処理します。

注記：データトラッキングオプションを使用する場合は、データの混同を避けるために、サンプル ID がワークテーブルのサンプルと同じ順序になるようにします。

13. 装置のドアを閉める。

14. 「START (スタート)」を押して、精製手順を開始します。

自動精製手順には 15~20 分かかります。

15. プロトコールが終了すると、ディスプレイに「Protocol finished (プロトコール終了)」と表示されます。▲ 「ENT」を押してレポートファイルを作成します。

EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL は、最大 10 個のレポートファイルを保存できます。レポートファイルは、接続しているプリンターで直接印刷することも、パソコンに転送することもできます。

16. 装置のドアを開ける。

17. 精製済み DNA を含む溶出チューブを回収します。DNA 溶液はすぐに使用できるほか、2~8° C で 24 時間、-30~-15° C ではさらに長期間保存可能。サンプル調製廃棄物を廃棄する。*

* サンプル廃液はグアニジン塩を含むため、漂白剤と共用できません。安全情報については、6 ページを参照してください。

精製済み DNA をリアルタイム PCR で分析する場合は、磁性粒子のキャリーオーバーのリスクを最小限に抑えるために、溶出液を含むチューブを最初に適切な磁性分離器に適用し、溶出液を清浄なチューブに移す必要があります。

18. ▲ オプション：画面の指示に従って、ワークテーブル表面の UV 除染を実行します。
19. 別のプロトコールをランするには、「ESC」を押し、関連するプロトコールの説明に従ってサンプルを調製し、ステップ4以降の手順に従う。もしくは、「STOP (ストップ)」を2回押してディスプレイの最初の画面に戻り、装置のドアを閉めて、EZ1 装置の電源を切る。
20. EZ1 装置を清掃する。

お使いの EZ1 装置に付属するユーザーマニュアルに記載されているメンテナンス手順に従ってください。

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 を参照してください。また、QIAGEN テクニカルサービスの科学者が、このハンドブックの内容やプロトコールに関するご質問にお答えします（連絡方法は、support.qiagen.com をご参照ください）。

コメントと推奨事項

問題点の説明

- | | |
|-------------------------|--|
| a) 装置ディスプレイにエラーメッセージが出る | EZ1 装置に付属のユーザーマニュアルを参照する。 |
| b) レポートファイルが印刷できない | プリンターが「PC/プリンター」シリアルポートを介して EZ1 Advanced または EZ1 Advanced XL に接続されているか確認する。
シリアルポートがプリンターに使用できるように設定されているか確認する。 |
| c) レポートファイルが PC に転送されない | プリンターが「PC/プリンター」シリアルポートを介して EZ1 Advanced または EZ1 Advanced XL に接続されているか確認する。
シリアルポートがプリンターに使用できるように設定されているか確認する。 |
| d) 間違った Q-Card ID を入力した | Q-Card ID ではない間違った ID を入力すると、EZ1 Advanced / EZ1 Advanced XL はその ID を受け入れず、正しい ID が入力されるまで Q-Card ID の入力を要求する。「STOP (ストップ)」を 2 回押して、メインメニューに戻る。 |

別の問題点の説明

- | | |
|----------------------|---|
| a) 磁性粒子が完全に再懸濁されていない | 試薬カートリッジを数回反転させて、磁性粒子を確実に再懸濁する。 |
| b) 試薬が十分に吸引されていない | 試薬カートリッジを反転させて磁性粒子を再懸濁した後、カートリッジを軽くたたいて、ウェルの底に試薬がたまるようにする。 |
| c) 精製済み DNA を水中で保存した | 水の代わりに TE バッファーで溶出する。TE バッファーで溶出すると同等の性能が得られ、安定性が向上し、少量の精製済み DNA を長期間保存できる。 |

コメントと推奨事項

- d) ビベッティング量がばらつく
- ビベッティング精度を上げるには、試薬カートリッジ内のバッファー量が正確で、フィルターチップがチップアダプターに最適にフィットしていることが重要。サンプルが完全に混和していること、試薬カートリッジが有効期限を過ぎていないことを確認する。装置のユーザーマニュアルに記載の通り、定期的にメンテナンスを実施する。ユーザーマニュアルに記載の通り、フィルターチップがフィットしていることを定期的にチェックする。

別の問題点の説明

- a) ダウンストリームアプリケーションで使
用した DNA が不十分
- 可能であれば、より多くの溶出液を使用してダウンストリームアプリケーションを繰り返す。
- b) ダウンストリームアプリケーションに使用した DNA が過剰
- 過剰な DNA は一部の酵素反応を阻害する可能性がある。溶出液を希釈するか、またはダウンストリームアプリケーションでの使用量を減らす。適切な方法を使用して吸光度を測定し、精製済み DNA を定量する。

付録 A : EZ1 Advanced レポートファイルの例

この付録では、EZ1 Advanced で作成する一般的なレポートファイルを紹介します。各パラメーターの値は、ご使用の EZ1 Advanced で作成したレポートファイルとは異なります。

「User ID (ユーザーID)」は最大 9 文字、「Assay kit ID (アッセイキット ID)」および「Note (注記)」は最大 14 文字であることにご注意ください。EZ1 Advanced XL は、EZ1 Advanced XL に関連する装置やプロトコルの情報、およびチャンネル 1~14 の情報を含む同様のレポートファイルを作成します。

REPORT - FILE EZ1 Advanced:

```
-----  
Serial No. EZ1 Advanced: _____ 0301F0172  
User ID: _____ 4121  
Firmware version: _____ V 1.0.0  
Installation date of instr.: _____ Jan 05, 2008  
Weekly maintenance done on: _____ Apr 15, 2008  
Yearly maintenance done on: _____ Mar 10, 2008  
Date of last UV-run: _____ Apr 20, 2008  
Start of last UV-run: _____ 16:06  
End of last UV-run: _____ 16:26  
Status UV-run: _____ o.k.  
Protocol name: _____ DNA Investigator  
_____  
Trace  
Date of run: _____ Apr 21, 2008  
Start of run: _____ 12:57  
End of run: _____ 13:31  
Status run: _____ o.k.  
Error Code: _____  
Sample input Vol [ul]: _____ 200  
Elution volume [ul]: _____ 100
```

Channel A:

Sample ID: _____ 123456789

Reagent Kit number: _____ 9801301

Reagent Lot number: _____ 23456789

Reagent Expiry date: _____ 1208

Assay kit ID: _____ 848373922

Note: _____ 2000

Channel B:

Sample ID: _____ 234567890

Reagent Kit number: _____ 9801301

Reagent Lot number: _____ 23456789

Reagent Expiry date: _____ 1208

Assay kit ID: _____ 836266738

Note: _____

Channel C:

Sample ID: _____ 345678901

Reagent Kit number: _____ 9801301

Reagent Lot number: _____ 23456789

Reagent Expiry date: _____ 1208

Assay kit ID: _____ 883727832

Notes: _____ 1000

Channel D:

Sample ID: _____ 456789012

Reagent Kit number: _____ 9801301

Reagent Lot number: _____ 23456789

Reagent Expiry date: _____ 1208

Assay kit ID: _____ 763684837

Note: _____

Channel E:

Sample ID: _____ 567890123

Reagent Kit number: _____ 9801301
Reagent Lot number: _____ 23456789
Reagent Expiry date: _____ 1208
Assay kit ID: _____ 4387728002
Note: _____
Channel F:
Sample ID: _____ 678901234
Reagent Kit number: _____ 9801301
Reagent Lot number: _____ 23456789
Reagent Expiry date: _____ 1208
Assay kit ID: _____ 509389403
Note: _____ 50

オーダーインフォメーション

製品	内容	カタログ 番号
EZ1&2 DNA Investigator Kit (48)	調製 48 回分：試薬カートリッジ、使い捨てチップホルダー、使い捨てフィルターチップ、サンプルチューブ、溶出チューブ、バッファー、試薬、分析証明書を含む	952034
EZ1 Advanced XL	EZ1 Kit を使用して最大 14 サンプルから核酸を自動精製する装置。部品と作業について 1 年間の保証*	9001492
EZ1 Advanced XL Flip-Cap Tube Rack	EZ1 Advanced XL で Flip-Cap チューブを使用するためのチューブラック	9022818
EZ1 Advanced XL DNA Investigator Flip-Cap Card	EZ1 Advanced XL Flip-Cap Tube Rack を備えた EZ1 Advanced XL を使用する DNA 精製用プログラム済みカード	9022763
EZ1 Advanced XL DNA Investigator Card	EZ1 Advanced XL の EZ1 Advanced XL DNA Investigator プロトコール用プログラム済みカード	9018699
EZ1 Advanced DNA Investigator Card	EZ1 Advanced DNA Investigator プロトコール用プログラム済みカード	9018302
EZ1 DNA Investigator Card	BioRobot EZ1 DNA Investigator プロトコール用プログラム済みカード	9016387
EZ2 Fx Connect	最大 24 サンプルから核酸を自動精製するロボット	9003221

* Priority Package Plus (カタログ番号 9001876) を推奨：3 年間保証、年 1 回の予防メンテナンス訪問、48 時間以内の優先対応、すべての作業、出張、部品修理。

製品	内容	カタログ 番号
	ト装置。部品と作業について 1 年間の保証	
アクセサリ		
Filter-Tips and Holders, EZ1 (50)	使い捨てフィルターチップ 50 個、使い捨てチップホルダー 50 個、EZ1 Kit で使用する追加のチップとホルダー	994900
12-Tube Magnet	12 x 1.5 mL または 2 mL チューブ内の磁性粒子分離用磁石	36912
Buffer G2 (260 mL)	EZ1 DNA 用の溶解バッファー	1014636
DTT (1 mL)	1M DTT、法医学グレード、精子細胞溶解用	1117316
Buffer MTL (54 mL)		19112
QIAGEN Proteinase K (1.2 mL)	1.2 mL (> 600 mAU/mL、溶液)	1014023
TissueLyser II	ユニバーサルラボラトリーミキサー・ミル破砕機	85300
Grinding Jar Set, S. Steel (2 x 10 mL)	粉碎ジャー (10 mL) 2 個、ステンレス鋼粉碎ボール 2 個 (20 mm)	69985
PC and TFT Monitor, 17"	最大 4 台の EZ1 Advanced または EZ1 Advanced XL 装置に接続可能な PC、PC 用モニター	XXX
HID 関連製品		
Investigator Lyse&Spin Basket Kit (50)	バスケット 50 個と採取チューブ 100 個を含むポーチ 50 個	19597
Investigator Lyse&Spin Basket Kit (250)	バスケット 5 x 50 個と採取チューブ 5 x 50 個を	19598

製品	内容	カタログ 番号
	含むポーチ 10 個	
Investigator Quantiplex Pro Kit (200)	Applied Biosystems 7500 Real-Time システムで使用：Quantiplex Pro Reaction Mix、Quantiplex Pro Primer Mix、Quantiplex Pro Control DNA M1、QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	387216
Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit (200)	QIAGEN Rotor-Gene Q Real-Time システムで使用：Quantiplex Pro RGQ Reaction Mix、Quantiplex Pro RGQ Primer Mix、Male Control DNA M1、QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	387316
Investigator 24plex QS Kit (100)*	Primer Mix、Fast Reaction Mix 2.0、Control DNA、allelic ladder、DNA Size Standard、ヌクレアーゼフリー水	382415
Investigator 26plex QS Kit (100)*	Primer Mix、Fast Reaction Mix 3.0、Control DNA、allelic ladder、24plex、ヌクレアーゼフリー水	382615
Investigator Argus X-12 QS Kit (25)*	Primer Mix、Fast Reaction Mix 2.0、Control DNA、allelic ladder、DNA Size Standard、ヌクレアーゼフリー水	383223
Investigator Argus Y-28 QS Kit (100)*	Primer Mix、Fast Reaction Mix 3.0、Control DNA、allelic ladder、DNA Size Standard、ヌクレアーゼフリー水	383625

* 大きなサイズも入手可能です。お問い合わせください。

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参照してください。QIAGEN キットハンドブックと

ユーザーマニュアルは www.qiagen.com から入手できます。または、QIAGEN テクニカルサービスやお近くの代理店にご依頼ください。

文書の改訂履歴

日付	変更
09/2021	「EZ1 DNA Investigator Kit」を「EZ1&2 DNA Investigator Kit」にリブランド。ハンドブックに、骨または歯から DNA を抽出する補足プロトコルを追加。注文情報セクションを更新。編集とレイアウトを変更。

注記

EZ1&2 DNA Investigator Kit に関する制限付きライセンス契約

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同意したものと見なされます。

1. 本製品は、共に提供されるプロトコールと本ハンドブックに沿ってのみ使用することができ、本キットに含まれるコンポーネントと共に使用することを目的としています。QIAGEN は、本製品と共に提供されるプロトコール、本ハンドブック、www.qiagen.com に掲載されている追加プロトコールに説明されている場合を除き、所有する知的財産の下、本キットに含まれるコンポーネントを本キットに含まれていないコンポーネントと共に使用する、または組み込むライセンスを一切許諾しません。追加プロトコールには、QIAGEN のユーザーが QIAGEN の他のユーザーに提供しているものもあります。このようなプロトコールは QIAGEN による十分なテストや最適化が施されていません。QIAGEN はこれらのプロトコールを保証せず、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 は本キットおよび/またはその使用が第三者の権利を侵害しないことを保証しません。
3. 本キット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ており、再利用、再生、再販はできません。
4. QIAGEN は、明示的に定めた場合を除き、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. 本キットの購入者とユーザーは、上記の禁止事項に至る、またはこれを助長する可能性のある行為を行わず、また他者に対しかかる行為を許容しないことに同意します。QIAGEN は、本制限付きライセンス契約の禁止事項の執行を法廷にて実施することができ、本制限付きライセンス契約の行使、または本キットおよび/またはそのコンポーネントに関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および法的措置の経費を回収するものとします。

最新の契約条項については、www.qiagen.com を参照してください。

商標：QIAGEN®、Sample to Insight®、BioRobot®、EZ1®、EZ1&2®、InhibitEX®、Investigator®、Quantiplex™ (QIAGEN Group); FTA® (Whatman グループ)。本書で使用し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も法的保護の対象から外れません。

09/2021 HB-0122-006 © 2021 QIAGEN、無断複写・転載を禁じます。

注文 www.qiagen.com/shop | テクニカルサポート support.qiagen.com | ウェブサイト www.qiagen.com