2021 年 12 月

EZ1&2™ DNA Investigator® Kit ハンドブック

EZ2® Connect Fx 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

Sample to Insight

QIAGEN

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

　　プロトコールの説明 8

ユーザーが準備する装置と試薬 12

重要な注意 13

　　スタートサンプル 13

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 19

プロトコール：精子細胞が混合した上皮細胞の前処理 21

プロトコール：骨または歯の前処理 23

プロトコール：DNA 精製（Trace プロトコール） 25

プロトコール：DNA 精製（「Tip Dance」プロトコール） 28

プロトコール：DNA 精製（Large-Volume プロトコール） 31

プロトコール：DNA 精製（Large-Volume プロトコール RT） 34

プロトコール：DNA 精製（Large-Volume プロトコール Heated） 37

プロトコール：DNA 精製（ノーマリゼーションプロトコール） 40

プロトコール：DNA 精製（ノーマリゼーション「Tip Dance」プロトコール） 43

トラブルシューティングガイド 46

オーダーインフォメーション 48
文書の改訂履歴 51

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 Tubes（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）	2

* 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、EZ2 Connect Fx 装置での試薬データのトラッキングに必要です。

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。

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、EZ2® Connect Fx、EZ1® Advanced XL、EZ1 Advanced、BioRobot® EZ1 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、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。

注意	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。

試薬カートリッジのバッファーには、塩酸グアニジン/チオシアン酸グアニジンが含まれており、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、適切な実験室用洗浄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浄剤と水で洗浄し、その後、1%（v/v）次亜塩素酸ナトリウムで洗浄してください。感染病原体を含む可能性がある液体が EZ2 Connect 装置にこぼれた場合は、まず汚染された部分を実験室用洗浄剤と水で洗浄し、その後、1%（v/v）次亜塩素酸ナトリウム、さらに水で洗浄してください。

品質管理

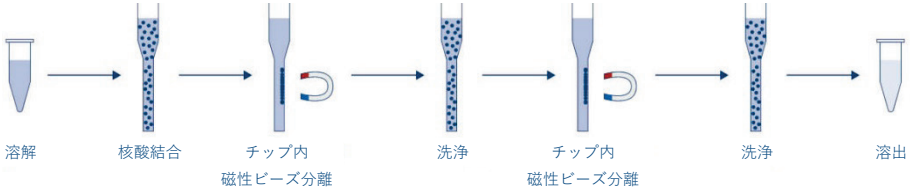
EZ1&2 DNA Investigator Kit の各ロットは、QIAGEN の ISO 認証済み品質管理システムに従い、既定の仕様に照らし合わせて検査し、一貫した製品の品質を確保しています。機能的 QC 検査により、EZ1&2 DNA Investigator Kit は、法医学者が求める高い基準を満たしています。EZ1&2 DNA Investigator Kit は、ISO18385 の要件を満たしています。

はじめに

EZ2 Connect Fx 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サンプル由来のゲノム DNA の精製を、再現可能な方法で自動化します。磁性粒子技術により、定量的リアルタイム PCR、STR 分析、NGS アプリケーション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。EZ2 Connect Fx 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 24 個のサンプルを処理できます。

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（下記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、溶出量を 20 µL～200 µL から選択できます。



プロトコールの説明

このハンドブックには、2 種類のプロトコールが記載されています（表 1）。

- 前処理用プロトコールでは、EZ2 Connect Fx 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 精製プロトコールでは、EZ2 Connect Fx 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。

前処理用プロトコール

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 精製プロトコール

前処理用プロトコールと組み合わせて使用できる 7 つの DNA 精製プロトコールがあります。各プロトコール内で、ユーザーは溶出量を 20～200 µL で、溶出を水または TE バッファーから指定できます。

プロトコール：DNA 精製（Trace プロトコール）は、200 µL の容量で効率的に溶解できるさまざまなタイプのサンプルすべてで使用できます。

プロトコール：DNA 精製（「Tip Dance」プロトコール）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。このプロトコールは、十分な収量が期待されるサンプルに使用できます。重要なサンプルの収量を最大化するために、Investigator Lyse&Spin Basket Kit と Large-Volume プロトコールを使用して、溶解物全体から DNA を回収することを推奨します。

Large-Volume プロトコールでは、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。標準的な Trace プロトコールと同じ溶出量で、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。Large-Volume プロトコールは、Investigator Lyse&Spin Basket Kit を用いて処理したサンプルに使用します。

EZ2 Connect Fx 装置では、ユーザーは、Large-Volume プロトコールの 3 つのバージョンから選択できます。

プロトコール：32 ページの DNA 精製（DNA Investigator Large-Volume プロトコール）は、EZ1 装置での Large-Volume プロトコールと同等です。サンプル溶解物に 400 µL の Buffer MTL を手動で追加する必要があります。試薬カートリッジのウェル 10 に充填したバッファーは使用しません。このプロトコールは、EZ1 装置と EZ2 装置間の同等性テストに使用できます。

プロトコール：35 ページの DNA 精製（DNA Investigator Large-Volume プロトコール RT）は、DNA Investigator Large-Volume プロトコールの変更バージョンです。DNA Investigator Large-Volume プロトコール RT では、ユーザーはサンプルチューブに MTL バッファーを手動で追加する必要はありません。EZ2 Connect Fx 装置は、試薬カートリッジのウェル 10 からサンプルチューブに直接、室温の MTL バッファーを追加します。

プロトコール：38 ページの DNA 精製（DNA Investigator Large-Volume プロトコール Heated は、DNA Investigator Large-Volume プロトコールの変更バージョンです。DNA Investigator Large-Volume プロトコール Heated では、ユーザーはサンプルチューブに MTL バッファーを手動で追加する必要はありません。EZ2 Connect Fx 装置は、試薬カートリッジのウェル 1 と 10 からの MTL バッファーを加温し、これをサンプルチューブに直接追加します。

プロトコール：DNA 精製（ノーマリゼーションプロトコール）は、最大結合容量を制限することにより、規定量の DNA を分離するためのものです。このプロトコールを使用して、

過剰な DNA を含むサンプル、たとえばレファレンスサンプルとして採取した口腔内スワブから、均一な収量を得ることができます。

プロトコール：DNA 精製（ノーマリゼーション「Tip Dance」プロトコール）では、ノーマリゼーションプロトコールと「Tip Dance」プロトコールを組み合わることにより、固体サンプルの処理が可能です。

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 M
血液/唾液	19 ページ	Trace	最大 50 µL	140 ～ 190 µL	10 µL	なし
FTA®カード	19 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	19 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	19 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	19 ページ	Trace または Tip Dance	1 cm^2	190 µL	10 µL	なし
紙/類似材料	19 ページ	Trace または Tip Dance	0.5～2.5 cm^2	190 µL	10 µL	なし
爪垢	19 ページ	Trace	最大 40 mg	190 µL	10 µL	なし
切った爪	19 ページ	Trace	1	160 µL	20 µL	20 µL
毛髪	19 ページ	Trace	0.5～1 cm	160 µL	20 µL	20 µL
組織	19 ページ	Trace	最大 10 mg	190 µL	10 µL	なし
血液または唾液の染み	19 ページ	Trace または Tip Dance	0.5 cm^2	290 µL	10 µL	なし
精液の染み	19 ページ	Trace または Tip Dance	0.5 cm^2	270 µL	10 µL	20 µL
大量	19 ページ	Large-Volume	多様	475 µL	25 µL	なし
大量の精液	19 ページ	Large-Volume	多様	455 µL	25 µL	20 µL
性的暴行のサンプル	21 ページ	Trace	多様	最大 2.5 mL*	20 µL	40 µL

骨または歯	23 ページ	Large-Volume	150～200 mg	225 µL	25 µL	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）

精子細胞が混入した上皮細胞由来 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
- 遠心分離機
- サーモミ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。EZ2 Connect Fx 装置は、DNA 精製用 Trace プロトコール（25 ページ）または「Tip Dance」プロトコール（28 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（31 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 µg/µL 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。

試薬カートリッジ中の沈殿物

ウェル 1（試薬カートリッジをセットした際に EZ2 Connect Fx 装置の前面に最も近いウェル）と試薬カートリッジのウェル 10 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 で保存していた場合は、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、DNA Investigator プロトコールで使用する溶解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、DNA Investigator プロトコールで最適の結果が得られます。

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® Pro 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も検出します。

EZ2 Connect Fx 試薬カートリッジ

一つのサンプルから核酸を精製するための試薬は、一つの試薬カートリッジに含まれています（図 1）。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。これらのポジションの準備の詳細は、ランセットアップ中に EZ2 Connect Fx の LED ディスプレイに表示されます。

図 1. 試薬カートリッジを使用した簡便なワークテーブルのセットアップ。(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。

EZ2 Connect Fx チップラック

EZ2 Connect Fx には、2 種類のチップラックが付属しています。1 つはスクリューキャップチューブに対応し、もう 1 つはフリップキャップチューブに対応します。EZ2 Connect Fx チップラックは、サンプルまたは溶出用にチップをチップホルダーとチューブに挿入した状態を維持します（図 2）。チップラックの装着方法の詳細は、ランセットアップ中に EZ2 Connect Fx の LED ディスプレイに表示されます。

図 2. EZ2 Connect Fx チップラック、チップホルダー、フィルターチップ

ワークテーブル

EZ2 Connect Fx 装置のワークテーブルは、ユーザーがカートリッジやチップラックをセットする場所です（図 3）。

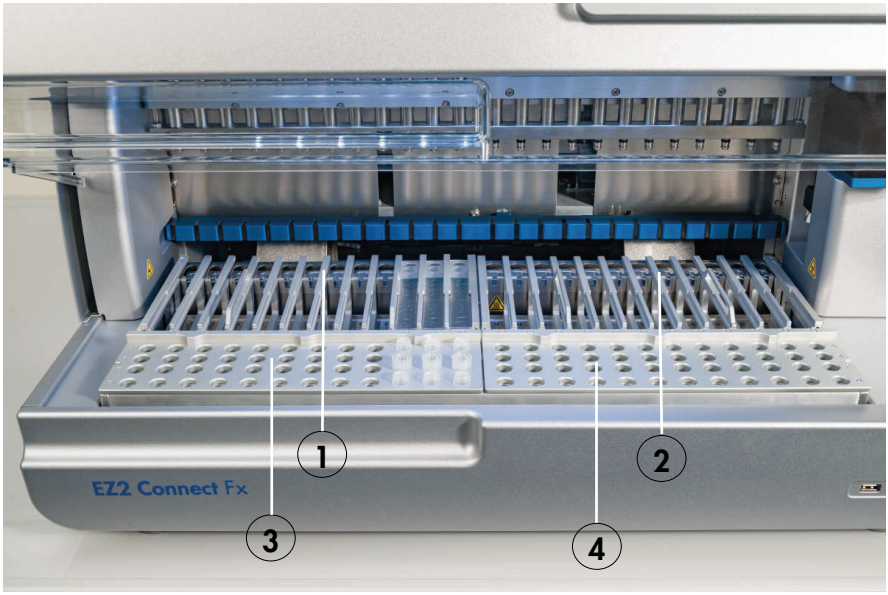


図 3. EZ2 Connect Fx ワークテーブル。

1. EZ2 Connect カートリッジラック – 左
2. EZ2 Connect カートリッジラック – 右
3. EZ2 Connect チップラック – 左
4. EZ2 Connect チップラック – 右

EZ2 Connect Fx の操作

EZ2 Connect Fx には、サンプル調製ワークフローをサポートするさまざまな機能があります。QIAsphere®を介したリモートアクセスや、バーコード読み取りによるデータインプット、ロードチェック、データの保存と転送、レポート作成、ガイド付き装置メンテナンスといった機能です。

EZ2 Connect Fx には、EZ1&2 DNA Investigator Kit を使用して核酸を精製するプロトコールがプリインストールされています。ユーザーは、装置のタッチスクリーンディスプレイでプロトコールを簡単に選択できます。直感的なソフトウェア/ユーザーインターフェイスは、可変パラメーターの選択などのランセットアッププロセスをガイドします。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も表示されます。

サンプルと試薬の吸引と分注、および磁性粒子の分離は、24 チャンネルのピペッターヘッドが行います。プロトコールで必要な場合、液体の温度は加熱システムによって制御されます。

このような機能の詳細については、*EZ2 Connect および EZ2 Connect Fx ユーザーマニュアル*をご参照ください。

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（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、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、フリップキャップチューブラックを使用して、EZ2 Connect Fx 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 分から一晩インキュベートする。

   DNA 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（14 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. 25 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. 28 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。感度を最大にするため、Investigator Lyse&Spin Basket Kit の使用を推奨します。

   5c. 31 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、14 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ステップ 4 で 56° C に、ステップ 12 で 70° C に加温します。

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 µL の Buffer G2 を加える。
3. 10 µL 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、25 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、31 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 x *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。これにより、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 25 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：骨または歯の前処理

このプロトコールは、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。このプロトコールでは Proteinase K と EDTA を使用したサンプルの破砕と溶解について説明します。

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。
- 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。

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、粉砕ジャーの蓋を閉め、**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砕します（粉砕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。より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 µL の Buffer G2 を追加する。
4. 25 µL の Proteinase K を追加する。
5. pH8.0、250 µL 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 2 時間以上、最長で 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。上清を新しい 2 mL サンプルチューブに移す。
9. 各 2 mL サンプルチューブに pH5.0、50 µL の 3 M NaOAc を追加する。
10. 各 2 mL サンプルチューブに 1 µL のキャリア RNA を追加する。
11. 引き続き 31 ページのプロトコール：DNA 精製（Large-Volume プロトコール）、34 ページの DNA 精製（Large-Volume プロトコール RT）、または 37 ページの DNA 精製（Large-Volume プロトコール Heated）を実行する。

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（19〜24 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、EZ2 Connect Fx 装置をセットアップしてランを開始する簡単な手法を説明します。

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。

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。13 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. EZ2 Connect Fx 装置の電源を入れる。
2. アプリケーションパネルの **DNA** をタップし、「DNA Investigator Kit」を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
3. プロトコール「DNA Investigator Trace」を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
4. チップラックタイプ、溶出バッファー、溶出量を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
5. 処理するサンプル数に応じてワークデッキ上のポジションを選択して「**Next**（次へ）」を押す。
6. サンプル ID を入力するか、「**Generate missing sample IDs**（欠落しているサンプル **ID** の作成）」を押す。「**Next**（次へ）」を押す。
7. ステップ 5 で選択したように、EZ1&2 DNA Investigator 試薬カートリッジを、EZ2 Connect Cartridge Rack の各ポジションにセットする。「**Next**（次へ）」を押す。
8. 装置のフードを開ける。EZ2 Connect Cartridge Rack を EZ2 Connect Fx 装置にセットする。
9. EZ2 Connect Tip Rack を次のように準備する（ポジションラベルは EZ2 Connect Tip Rack に刻印されている）。

   標準チップラック

   - ポジション A：サンプルが入った蓋の開いた 2.0 mL チューブ
   - ポジション B：空
   - ポジション C：チップを挿入したチップホルダー
   - ポジション D：蓋の開いた空の 1.5 mL 溶出チューブ

   フリップキャップラック

   - ポジション A：サンプルが入った蓋の開いた 2.0 mL チューブ
   - ポジション B：チップを挿入したチップホルダー
   - ポジション C：蓋の開いた空の 1.5 mL 溶出チューブ

   「**Next**（次へ）」を押す。

10. EZ2 Connect Tip Rack を EZ2 Connect Fx 装置にセットし、装置ディスプレイの指示に従ってランを開始する。装置はロードチェックを実行する。ロードチェックが不要な場合は、「**Skip load check**（ロードチェックをスキップ）」を押して開始する。
11. ランが完了すると、ディスプレイに「Protocol finished（プロトコール終了）」と表示される。「**Finish**（完了）」を選択する。
12. 装置のフードを開ける。精製済み核酸が入った溶出チューブを EZ2 Connect Tip Rack のポジション 1 から取り出す。廃液を含む使用済みカートリッジ、使用済みチップとホルダー、およびサンプルチューブを廃棄する。

    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。
13. ランが終了するたびに定期メンテナンスを行う。「**Finish**（完了）」を押してホーム画面に戻る。

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（19〜24 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。「Tip Dance」プロトコールでは、フィルターチップがピペッ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。このプロトコールでは、EZ2 Connect Fx 装置をセットアップしてランを開始する簡単な手法を説明します。

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。

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。13 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. EZ2 Connect Fx 装置の電源を入れる。
2. アプリケーションパネルの **DNA** をタップし、「DNA Investigator Kit」を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
3. プロトコール「DNA Investigator Tip Dance」を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
4. チップラックタイプ、溶出バッファー、溶出量を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
5. 処理するサンプル数に応じてワークデッキ上のポジションを選択して「**Next**（次へ）」を押す。
6. サンプル ID を入力するか、「**Generate missing sample IDs**（欠落しているサンプル **ID** の作成）」を押す。「**Next**（次へ）」を押す。
7. ステップ 5 で選択したように、EZ1&2 DNA Investigator 試薬カートリッジを、EZ2 Connect Cartridge Rack の各ポジションにセットする。「**Next**（次へ）」を押す。
8. 装置のフードを開ける。EZ2 Connect Cartridge Rack を EZ2 Connect Fx 装置にセットする。
9. EZ2 Connect Tip Rack を次のように準備する（ポジションラベルは EZ2 Connect Tip Rack に刻印されている）。

   標準チップラック

   - ポジション A：サンプルが入った蓋の開いた 2.0 mL チューブ
   - ポジション B：空
   - ポジション C：チップを挿入したチップホルダー
   - ポジション D：蓋の開いた空の 1.5 mL 溶出チューブ

   フリップキャップラック

   - ポジション A：サンプルが入った蓋の開いた 2.0 mL チューブ
   - ポジション B：チップを挿入したチップホルダー
   - ポジション C：蓋の開いた空の 1.5 mL 溶出チューブ

   「**Next**（次へ）」を押す。

10. EZ2 Connect Tip Rack を EZ2 Connect Fx 装置にセットし、装置ディスプレイの指示に従ってランを開始する。装置はロードチェックを実行する。ロードチェックが不要な場合は、「**Skip load check**（ロードチェックをスキップ）」を押して開始する。
11. ランが完了すると、ディスプレイに「Protocol finished（プロトコール終了）」と表示される。「**Finish**（完了）」を選択する。
12. 装置のフードを開ける。精製済み核酸が入った溶出チューブを EZ2 Connect Tip Rack のポジション 1 から取り出す。廃液を含む使用済みカートリッジ、使用済みチップとホルダー、およびサンプルチューブを廃棄する。

    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。
13. ランが終了するたびに定期メンテナンスを行う。「**Finish**（完了）」を押してホーム画面に戻る。

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（19〜26 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、EZ2 Connect Fx 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 µL 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。

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。13 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。
- 各サンプル溶解物に Buffer MTL 400 µL を追加します。このプロトコールでは、試薬カートリッジのウェル 10 に含まれる Buffer MTL を使用しません。自動追加の場合は、「Large Volume RT」または「Large Volume Heated」プロトコールを選択してください。

操作手順

1. EZ2 Connect Fx 装置の電源を入れる。
2. アプリケーションパネルの **DNA** をタップし、「DNA Investigator Kit」を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
3. プロトコール「DNA Investigator Large Volume」を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
4. チップラックタイプ、溶出バッファー、溶出量を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
5. 処理するサンプル数に応じてワークデッキ上のポジションを選択して「**Next**（次へ）」を押す。
6. サンプル ID を入力するか、「**Generate missing sample IDs**（欠落しているサンプル **ID** の作成）」を押す。「**Next**（次へ）」を押す。
7. ステップ 5 で選択したように、EZ1&2 DNA Investigator 試薬カートリッジを、EZ2 Connect Cartridge Rack の各ポジションにセットする。「**Next**（次へ）」を押す。
8. 装置のフードを開ける。EZ2 Connect Cartridge Rack を EZ2 Connect Fx 装置にセットする。
9. EZ2 Connect Tip Rack を次のように準備する（ポジションラベルは EZ2 Connect Tip Rack に刻印されている）。

   標準チップラック

   - ポジション A：サンプルが入った蓋の開いた 2.0 mL チューブ
   - ポジション B：空
   - ポジション C：チップを挿入したチップホルダー
   - ポジション D：蓋の開いた空の 1.5 mL 溶出チューブ

フリップキャップラック

- ポジション A：サンプルが入った蓋の開いた 2.0 mL チューブ
- ポジション B：チップを挿入したチップホルダー
- ポジション C：蓋の開いた空の 1.5 mL 溶出チューブ

「**Next**（次へ）」を押す。

10. EZ2 Connect Tip Rack を EZ2 Connect Fx 装置にセットし、装置ディスプレイの指示に従ってランを開始する。装置はロードチェックを実行する。ロードチェックが不要な場合は、「**Skip load check**（ロードチェックをスキップ）」を押して開始する。
11. ランが完了すると、ディスプレイに「Protocol finished（プロトコール終了）」と表示される。「**Finish**（完了）」を選択する。
12. 装置のフードを開ける。精製済み核酸が入った溶出チューブを EZ2 Connect Tip Rack のポジション 1 から取り出す。廃液を含む使用済みカートリッジ、使用済みチップとホルダー、およびサンプルチューブを廃棄する。なお、液体は抽出プロセス中にサンプルチューブに廃棄されている。

    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。
13. ランが終了するたびに定期メンテナンスを行う。「**Finish**（完了）」を押してホーム画面に戻る。

プロトコール：DNA 精製（Large-Volume プロトコール RT）

このプロトコールは、このハンドブック（19〜26 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、EZ2 Connect Fx 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 µL 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。

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。13 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. EZ2 Connect Fx 装置の電源を入れる。
2. アプリケーションパネルの **DNA** をタップし、「DNA Investigator Kit」を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
3. プロトコール「DNA Investigator Large Volume RT」を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
4. チップラックタイプ、溶出バッファー、溶出量を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
5. 処理するサンプル数に応じてワークデッキ上のポジションを選択して「**Next**（次へ）」を押す。
6. サンプル ID を入力するか、「**Generate missing sample IDs**（欠落しているサンプル **ID** の作成）」を押す。「**Next**（次へ）」を押す。
7. ステップ 5 で選択したように、EZ1&2 DNA Investigator 試薬カートリッジを、EZ2 Connect Cartridge Rack の各ポジションにセットする。「**Next**（次へ）」を押す。
8. 装置のフードを開ける。EZ2 Connect Cartridge Rack を EZ2 Connect Fx 装置にセットする。
9. EZ2 Connect Tip Rack を次のように準備する（ポジションラベルは EZ2 Connect Tip Rack に刻印されている）。

   標準チップラック

   - ポジション A：サンプルが入った蓋の開いた 2.0 mL チューブ
   - ポジション B：空
   - ポジション C：チップを挿入したチップホルダー
   - ポジション D：蓋の開いた空の 1.5 mL 溶出チューブ

   フリップキャップラック

   - ポジション A：サンプルが入った蓋の開いた 2.0 mL チューブ
   - ポジション B：チップを挿入したチップホルダー

- ポジション C：蓋の開いた空の 1.5 mL 溶出チューブ

「**Next**（次へ）」を押す。

10. EZ2 Connect Tip Rack を EZ2 Connect Fx 装置にセットし、装置ディスプレイの指示に従ってランを開始する。装置はロードチェックを実行する。ロードチェックが不要な場合は、「**Skip load check**（ロードチェックをスキップ）」を押して開始する。
11. ランが完了すると、ディスプレイに「Protocol finished（プロトコール終了）」と表示される。「**Finish**（完了）」を選択する。
12. 装置のフードを開ける。精製済み核酸が入った溶出チューブを EZ2 Connect Tip Rack のポジション 1 から取り出す。廃液を含む使用済みカートリッジ、使用済みチップとホルダー、およびサンプルチューブを廃棄する。なお、液体は抽出プロセス中にサンプルチューブに廃棄されている。

    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。
13. ランが終了するたびに定期メンテナンスを行う。「**Finish**（完了）」を押してホーム画面に戻る。

プロトコール：DNA 精製（Large-Volume プロトコール Heated）

このプロトコールは、このハンドブック（19〜26 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、EZ2 Connect Fx 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 µL 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。

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。13 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. EZ2 Connect Fx 装置の電源を入れる。
2. アプリケーションパネルの **DNA** をタップし、「DNA Investigator Kit」を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
3. プロトコール「DNA Investigator Large Volume 加熱」を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
4. チップラックタイプ、溶出バッファー、溶出量を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
5. 処理するサンプル数に応じてワークデッキ上のポジションを選択して「**Next**（次へ）」を押す。
6. サンプル ID を入力するか、「**Generate missing sample IDs**（欠落しているサンプル **ID** の作成）」を押す。「**Next**（次へ）」を押す。
7. ステップ 5 で選択したように、EZ1&2 DNA Investigator 試薬カートリッジを、EZ2 Connect Cartridge Rack の各ポジションにセットする。「**Next**（次へ）」を押す。
8. 装置のフードを開ける。EZ2 Connect Cartridge Rack を EZ2 Connect Fx 装置にセットする。
9. EZ2 Connect Tip Rack を次のように準備する（ポジションラベルは EZ2 Connect Tip Rack に刻印されている）。

標準チップラック

- ポジション A：サンプルが入った蓋の開いた 2.0 mL チューブ
- ポジション B：空
- ポジション C：チップを挿入したチップホルダー
- ポジション D：蓋の開いた空の 1.5 mL 溶出チューブ

フリップキャップラック

- ポジション A：サンプルが入った蓋の開いた 2.0 mL チューブ
- ポジション B：チップを挿入したチップホルダー
- ポジション C：蓋の開いた空の 1.5 mL 溶出チューブ

「**Next**（次へ）」を押す。

10. EZ2 Connect Tip Rack を EZ2 Connect Fx 装置にセットし、装置ディスプレイの指示に従ってランを開始する。装置はロードチェックを実行する。ロードチェックが不要な場合は、「**Skip load check**（ロードチェックをスキップ）」を押して開始する。
11. ランが完了すると、ディスプレイに「Protocol finished（プロトコール終了）」と表示される。「**Finish**（完了）」を選択する。
12. 装置のフードを開ける。精製済み核酸が入った溶出チューブを EZ2 Connect Tip Rack のポジション 1 から取り出す。廃液を含む使用済みカートリッジ、使用済みチップとホルダー、およびサンプルチューブを廃棄する。なお、液体は抽出プロセス中にサンプルチューブに廃棄されている。

    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。
13. ランが終了するたびに定期メンテナンスを行う。「**Finish**（完了）」を押してホーム画面に戻る。

プロトコール：DNA 精製（ノーマリゼーションプロトコール）

このプロトコールは、このハンドブック（19〜26 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、最大結合容量を制限することにより規定量の DNA を分離します。このプロトコールを使用すると、過剰な DNA を含むサンプル、たとえばレファレンスサンプルとして採取した口腔スワブから、均一な収量を得ることができます。

このプロトコールでは、EZ2 Connect Fx 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。

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。

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。13 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. EZ2 Connect Fx 装置の電源を入れる。
2. アプリケーションパネルで **DNA** をタップし、「DNA Investigator Kit」を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
3. プロトコール「DNA Investigator Normalization」を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
4. チップラックタイプ、溶出バッファー、溶出量を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
5. 処理するサンプル数に応じてワークデッキ上のポジションを選択して「**Next**（次へ）」を押す。
6. サンプル ID を入力するか、「**Generate missing sample IDs**（欠落しているサンプル **ID** の作成）」を押す。「**Next**（次へ）」を押す。
7. ステップ 5 で選択したように、EZ1&2 DNA Investigator 試薬カートリッジを、EZ2 Connect Cartridge Rack の各ポジションにセットする。「**Next**（次へ）」を押す。
8. 装置のフードを開ける。EZ2 Connect Cartridge Rack を EZ2 Connect Fx 装置にセットする。
9. EZ2 Connect Tip Rack を次のように準備する（ポジションラベルは EZ2 Connect Tip Rack に刻印されている）。

   標準チップラック

   - ポジション A：サンプルが入った蓋の開いた 2.0 mL チューブ
   - ポジション B：空
   - ポジション C：チップを挿入したチップホルダー
   - ポジション D：蓋の開いた空の 1.5 mL 溶出チューブ

   フリップキャップラック

   - ポジション A：サンプルが入った蓋の開いた 2.0 mL チューブ
   - ポジション B：チップを挿入したチップホルダー
   - ポジション C：蓋の開いた空の 1.5 mL 溶出チューブ

   「**Next**（次へ）」を押す。
10. EZ2 Connect Tip Rack を EZ2 Connect Fx 装置にセットし、装置ディスプレイの指示に従ってランを開始する。装置はロードチェックを実行する。ロードチェックが不要な場合は、「**Skip load check**（ロードチェックをスキップ）」を押して開始する。

11. ランが完了すると、ディスプレイに「Protocol finished（プロトコール終了）」と表示される。「**Finish**（完了）」を選択する。
12. 装置のフードを開ける。精製済み核酸が入った溶出チューブを EZ2 Connect Tip Rack のポジション 1 から取り出す。廃液を含む使用済みカートリッジ、使用済みチップとホルダー、およびサンプルチューブを廃棄する。

    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。
13. ランが終了するたびに定期メンテナンスを行う。「**Finish**（完了）」を押してホーム画面に戻る。

プロトコール：DNA 精製（ノーマリゼーション「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（19〜26 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、最大結合容量を制限することにより、規定量の DNA を分離します。このプロトコールを使用すると、過剰な DNA を含むサンプル、たとえばレファレンスサンプルとして採取した口腔スワブから、均一な収量を得ることができます。「Tip Dance」プロトコールでは、フィルターチップがピペッ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。

このプロトコールでは、EZ2 Connect Fx 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。

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。

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。13 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. EZ2 Connect Fx 装置の電源を入れる。
2. アプリケーションパネルの **DNA** をタップし、「DNA Investigator Kit」を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
3. プロトコール「DNA Investigator Normalization Tip Dance」を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
4. チップラックタイプ、溶出バッファー、溶出量を選択して「**Next**（次へ）」を押す。
5. 処理するサンプル数に応じてワークデッキ上のポジションを選択して「**Next**（次へ）」を押す。
6. サンプル ID を入力するか、「**Generate missing sample IDs**（欠落しているサンプル **ID** の作成）」を押す。「**Next**（次へ）」を押す。
7. ステップ 5 で選択したように、EZ1&2 DNA Investigator 試薬カートリッジを、EZ2 Connect Cartridge Rack の各ポジションにセットする。「**Next**（次へ）」を押す。
8. 装置のフードを開ける。EZ2 Connect Cartridge Rack を EZ2 Connect Fx 装置にセットする。
9. EZ2 Connect Tip Rack を次のように準備する（ポジションラベルは EZ2 Connect Tip Rack に刻印されている）。

   標準チップラック

   - ポジション A：サンプルが入った蓋の開いた 2.0 mL チューブ
   - ポジション B：空
   - ポジション C：チップを挿入したチップホルダー
   - ポジション D：蓋の開いた空の 1.5 mL 溶出チューブ

   フリップキャップラック

   - ポジション A：サンプルが入った蓋の開いた 2.0 mL チューブ
   - ポジション B：チップを挿入したチップホルダー

- ポジション C：蓋の開いた空の 1.5 mL 溶出チューブ

「**Next**（次へ）」を押す。

10. EZ2 Connect Tip Rack を EZ2 Connect Fx 装置にセットし、装置ディスプレイの指示に従ってランを開始する。装置はロードチェックを実行する。ロードチェックが不要な場合は、「**Skip load check**（ロードチェックをスキップ）」を押して開始する。
11. ランが完了すると、ディスプレイに「Protocol finished（プロトコール終了）」と表示される。「**Finish**（完了）」を選択する。
12. 装置のフードを開ける。精製済み核酸が入った溶出チューブを EZ2 Connect Tip Rack のポジション 1 から取り出す。廃液を含む使用済みカートリッジ、使用済みチップとホルダー、およびサンプルチューブを廃棄する。

    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。
13. ランが終了するたびに定期メンテナンスを行う。「**Finish**（完了）」を押してホーム画面に戻る。

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
取り扱い全般	
a） 装置ディスプレイにエラーメッセージが出る	EZ2 Connect Fx 装置に付属のユーザーマニュアルを参照する。
試薬カートリッジの取り扱い	
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） ピペッティング量がばらつく	ピペ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。

	コメントと推奨事項
DNA の安定性	
a） 水中で保存した DNA の安定性	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。
b） プラスチック表面の DNA の消失	キャリア RNA を使用すると、保存に使用するチューブやプレートの表面に DNA が吸着するのを防ぐことができる。
ダウンストリームアプリケーション	
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 STR 増幅に過度の負荷をかける可能性がある。リアルタイム PCR ベースの方法で精製済みヒト DNA を定量する。
c） 阻害	通常、溶出液に阻害物質は含まれていない。まれに（古い骨など）、阻害物質がキャリーオーバーすることがある。可能であれば、増幅に使用するサンプル量を減らすか、溶出液を再精製する。

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
EZ2 Fx Connect	最大 24 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	9003221
アクセサリー		
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

製品	内容	カタログ番号
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)	粉砕ジャー（10 mL）2 個、ステンレス鋼粉砕ボール 2 個（20 mm）	69985
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 個を含むポーチ 10 個	19598
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

製品	内容	カタログ番号
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 ESSplex SE 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	381575
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
12/2021	初版

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合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 回のみの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®、QIAcard®、BioRobot®、EZ1®、EZ1&2™、EZ2®、Investigator®、QIAsphere®、Quantiplex® (QIAGEN Group); FTA® (Whatman Group)。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。

12/2021 HB-2984-001 © 2021 QIAGEN、無断複写・転載を禁じます。