

英語版 January 2011 に対応

QIAxcel™ RNA プロトコールとトラブルシューティング

QIAxcel システムを用いて RNA の定量／定性自動解析



Sample & Assay Technologies

目次

重要事項	3
QIAxcel Gel Cartridge とバッファートレイの準備	3
サンプル調製	8
メソッドの選択	9
プロトコール	
QIAxcel ScreenGel Software を用いた RNA の定性／定量解析	10
BioCalculator Software を用いた RNA の定性／定量解析	13
トラブルシューティング	16
Appendix A : QIAxcel ScreenGel Software を用いた Process Profile 作製	19
Appendix B : データ解析	20
QIAxcel ScreenGel Software を用いたデータ解析	20
BioCalculator Software を用いたデータ解析	26

保存上のご注意

QIAxcel Gel Cartridge :

■ 保存温度の変更

これまで QIAxcel Gel Cartridge は室温保存としておりましたが、今後は開封まで冷蔵（2～8℃）保存をお願いします。冷蔵保存することにより、QIAxcel Gel Cartridge の性能がより保持されます。

■ 開封後の保存

開封後は、これまでどおり QIAxcel 装置内で Latch 状態、かつバッファを満たしたバッファートレイを“Park”の状態にしてキャピラリーの先端がバッファートレイに浸かっている状態で、室温で保存してください。ただし、開封後であっても 4～5 日以上使用しない場合は、QIAxcel Gel Cartridge の裏側の purge port にシールを貼り、blister package（遮光のため黒いケースに変更）のソフトゲルにキャピラリーの先端が入るように戻し、垂直に立てた状態で上下を保ったまま、冷蔵保存してください。

QX RNA Denaturation Buffer :

2～8℃で保存してください。

QX RNA Size Marker 200–6000 nt :

-20～-80℃で保存してください。

重要事項

QIAxcel Gel Cartridge とバッファートレイの準備

ここではRNA解析前に行なうQIAxcel RNA Quality Control Cartridgeとバッファートレイの準備の方法を記述しています。

実験を始める前の重要事項

- キットに添付されているバッファ容量は、規定のサンプル・ラン数に十分です。バッファの追加購入も可能です(英語版 Handbook 51 ページの“Ordering Information”を参照)。
- QX RNA Alignment Marker と QX Intensity Calibration Marker (必要な場合) の入った 0.2 ml 12-Tube Strip を MARKER1 および MARKER2 の位置に軽く差し込みます (5 ページの “QX RNA Alignment Marker の準備” および 6 ページの “インテンシティキャリブレーション” 参照)。
- QX RNA Alignment Marker は 15 ~ 20 回の泳動を行なうごと、あるいは 3 日ごとの、いずれか先行する方に従って交換してください。各種マーカーあるいはバッファの追加購入も可能です(英語版 Handbook 51 ページの “Ordering Information” を参照)。
- QX RNA Alignment Marker の入った 12-Tube Strip を使用しない場合は -20℃ で保存してください。
- 最高の性能を発揮するためには、使用まで QIAxcel Gel Cartridge を 2 ~ 8℃ で保存してください。使用前に QIAxcel Gel Cartridge を QX Cartridge Stand にセットしてカバーで覆うか、あるいはバッファを入れたバッファートレイを装置の “Park Position” に設置後、QIAxcel Gel Cartridge をセットし、最低 20 分間静置します。

実験開始前の準備事項

- -20℃ で保存していた QX RNA Alignment Marker の入った 12-Tube Strip を室温 (15 ~ 25℃) に戻し、スピンドウンしてから使用します。
- QIAxcel Gel Cartridge を初めて使用される場合は、インテンシティキャリブレーションを行なう必要があります (詳細は 6 ページの “インテンシティキャリブレーション”、あるいは QIAxcel User Manual の Section 5.4、QIAxcel Advanced User Manual の Section 6.5.1 を参照)。QIAxcel Gel Cartridge が既にキャリブレーションされている場合はこのステップは不要ですが、異なる QIAxcel あるいは QIAxcel Advanced 装置や異なるコンピューターを使用するときはインテンシティキャリブレーションが必要です。ただし、異なるコンピューターを使用して QIAxcel あるいは QIAxcel Advanced 装置を操作する場合、前に使っていたコンピューターのキャリブレーションログファイルを新しいコンピューターに移動させれば、再キャリブレーションは不要です。

QIAxcel Gel Cartridge の開封と準備

最高の性能を発揮するためには、使用まで QIAxcel Gel Cartridge を 2 ~ 8℃ で保存してください。使用前に QIAxcel Gel Cartridge は QX Cartridge Stand にセットしてカバーで覆うか、あるいはバッファーを入れたバッファートレイを装置の “Park Position” に設置後、QIAxcel Gel Cartridge をセットし、最低 20 分間静置します。

1. キットの箱から全てのバッファー容器を取り出す。
2. 10ml の QX Wash Buffer を QX Cartridge Stand (QIAxcel 装置に添付) の両 reservoirs に入れて、2 ml のミネラルオイル (同梱) を重層し蒸発を防ぐ。
3. QIAxcel Gel Cartridge をパッケージから取り出し、慎重にキャピラリーチップのソフトゲル残渣を柔らかいティッシュペーパーで拭き取る。
4. QIAxcel Gel Cartridge の背面から purge port seal を剥がし、QX Cartridge Stand に Gel Cartridge をセットする。QIAxcel Gel Cartridge を保存する必要がある場合には purge port seal を廃棄しない(QX Cartridge Stand にセットし、purge port seal をして保存することも可能なため)。

注：Purge port から洩れたゲルは全て柔らかいティッシュペーパーで拭き取ります。

注：キャピラリーチップが QX Wash Buffer に浸っていることを確認してください。

5. 新しいカートリッジは QX Cartridge Stand にセットし、使用前に最低 20 分間安定化する。

注：1 回使用した QIAxcel Gel Cartridge は垂直にして保存します。詳細は英語版 Handbook 5 ページの “Storage” を参照ください。



QIAxcel Gel Cartridge の準備

バッファートレイの準備

1. 使用前にすべての試薬を室温（15 ~ 25℃）に戻す。
2. バッファートレイを温水で洗浄し、脱イオン水ですすぐ。
3. バッファートレイの WP および WI の位置を 8 ml の QX Wash Buffer で満たす。
4. バッファートレイの BUFFER の位置を 18 ml の QX Separation Buffer で満たす。
5. 溶液の蒸発を防ぐためにこれら 3 つの位置にミネラルオイルを慎重に添加する：2 ml のミネラルオイルを WP と WI の位置に、4 ml のミネラルオイルを BUFFER の位置に重層する。
6. 12-tube strips 用のスロットが装置の前面側にくるようにバッファートレイをバッファートレイ・ホルダーに入れる。

QX RNA Alignment Marker の準備

1. 15 μ l の QX RNA Alignment Marker を QX 0.2 ml 12-Tube Strip の各チューブにアプライする。
2. 各チューブにミネラルオイルを 1 滴添加して、strip をバッファートレイの MARKER1 の位置にセットする。



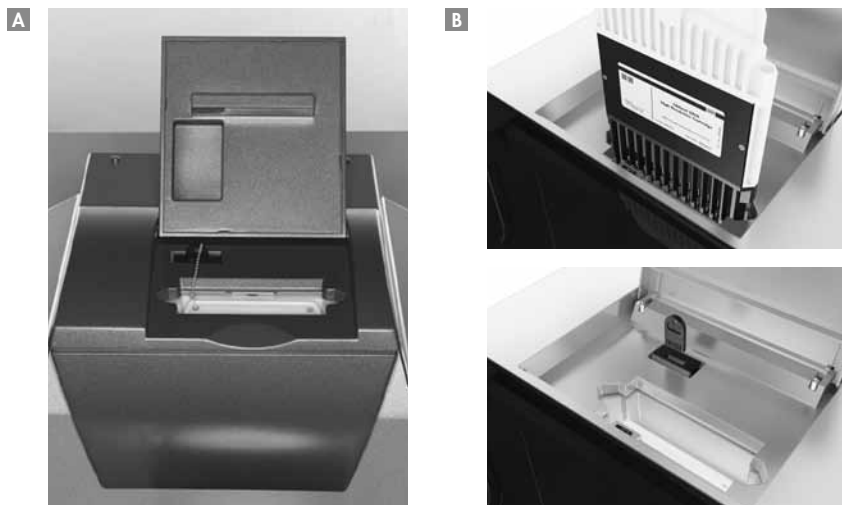
バッファートレイを準備しバッファートレイ・ホルダーに挿入

QIAxcel Gel Cartridge と Smart key の取り付け

1. QIAxcel Gel Cartridge を QX Cartridge Stand から取り出す。
2. Cartridge door を開き、QIAxcel Gel Cartridge を QIAxcel あるいは QIAxcel Advanced 装置にセットする。Cartridge 情報ラベルを装置の正面に、purge port を装置の背面に向けた状態にする。
3. Smart key を smart key socket に差し込む。Smart key には裏表がないのでどちらの方向にも挿入可能。
4. Cartridge Door を閉める。

5. Smart key を差し込むと、cartridge ID、ラン残数、cartridge type がソフトウェアに自動的に表示される。

注：Smart key が差し込まれていない場合、装置はカートリッジを認識せず、動作しません。



QIAxcel Gel Cartridge と Smart key の取り付け（A：QIAxcel および B：QIAxcel Advanced 装置）

インテンシティキャリブレーション

全ての QIAxcel Gel Cartridge は、サンプル解析の前に、インテンシティキャリブレーションが必要です。各キャピラリーのインテンシティは標準化され、次の泳動から反映されます。これは、インテンシティの読み取りの際に生じるカートリッジの各キャピラリー間のばらつきを補正します。

QIAxcel ScreenGel Software を用いたインテンシティキャリブレーション

各カートリッジのインテンシティキャリブレーションのデータはカートリッジと装置の ID に従ったファイル名で保存されます（<cartridge-id>_<instrument-id>.xcc）。このファイルは、デフォルトのディレクトリ **C:\Documents and Settings\All Users\Application Data\QIAGEN\QIAxcel\ScreenGel\Data\CartridgeCalibrationData** あるいはユーザー指定のディレクトリに保存されます。

もしキャリブレーションファイルの入ったコンピューターとは異なるコンピューターを使用する場合は、キャリブレーションファイルを新しいコンピューターに移すか、あるいはカートリッジの再キャリブレーションが必要です。同様に、キャリブレーション済みの QIAxcel 装置とは異なる装置で QIAxcel Gel Cartridge を使用する場合、インテンシティキャリブレーションを再度行なう必要があります。

カートリッジのインテンシティキャリブレーションは、約 16 分必要です。

1. 15 μ l の QX Intensity Calibration Marker を QX Colored 0.2 ml 12-Tube Strip の各チューブにアプライする。ミネラルオイルを 1 滴添加して、strip をバツファートレイの MARKER2 の位置にセットする。
2. “Service” 環境にある “Calibration” 画面の “Start calibration” ボタンをクリックしてキャリブレーションを開始する。
3. キャリブレーションが完了すると、ゲルイメージあるいはエレクトロフェログラムの隣にキャリブレーション結果が表示される。results テーブルには、各チャンネルの面積、キャリブレーションファクター、および結果 (“Pass” あるいは “Fail”) が表示される。

注：キャリブレーションを行なった後のカートリッジは、標準化面積が 0.004 ~ 0.006 の範囲内に収まっている必要があります。

4. キャリブレーション後の初めてのランで、1 つ以上のチャンネルでシグナルが見られなかった場合、英語版 Handbook 41 ページの Appendix D を参照する。
5. 1 つ以上のチャンネルで、バックグラウンドが高い場合は、QIAxcel User Manual あるいは QIAxcel Advanced User Manual の Section 8 を参照する。
6. キャリブレーションが 3 回以上失敗した場合は、キアゲンテクニカルサポート (TEL : 03-6890-7300、E-mail : techservice-jp@qiagen.com) にご連絡ください。

QIAxcel ScreenGel Software を用いた再キャリブレーション

カートリッジの再キャリブレーションには、“QIAxcel ScreenGel Software を用いたインテンシティキャリブレーション” (6 ページ) に記載されている操作をもう一度行ないます。再キャリブレーションの際に、前回のキャリブレーション結果が破棄されます。

注：キャリブレーションランが残っていないカートリッジをキャリブレーションすることが可能です。この場合、1 回のキャリブレーションランの代わりに 3 回の残っている通常のランが使用されます。

BioCalculator Software を用いたインテンシティキャリブレーション

各カートリッジのインテンシティキャリブレーションデータ (個々のキャリブレーションデータファイル) は、**CALdata** フォルダの中に保存されます。このフォルダは BioCalculator root directory ; **C:\Program Files\QIAxcel BioCalculator** にあります。

Calibration2.log ファイル (カートリッジキャリブレーション情報) は BioCalculator root directory ; **C:\Program Files\QIAxcel BioCalculator** に自動的に保存されます。

もし **Calibration2.log** ファイルの入ったコンピューターとは異なるコンピューターを使用する場合は、**Calibration2.log** ファイルを新しいコンピューターに移します。あるいはカートリッジの再キャリブレーションが必要です。同様に、QIAxcel Gel Cartridge をキャリブレーション済みの QIAxcel 装置とは異なる装置で使用する場合、もう一度インテンシティキャリブレーションを行ないます。

カートリッジのインテンシティキャリブレーションは約 16 分必要です。

1. 15 μ l の QX Intensity Calibration Marker 溶液を QX Colored 0.2 ml 12-Tube Strip の各チューブに分注する。溶液中に気泡がないことを確認して、バッファートレイの MARKER2 の位置に差し込む。
2. “Instrument Control” 画面の “File” をクリックして、“Intensity Calibration” を選択し、キャリブレーションウィザードを開始する。
3. “Start” をクリックして Cartridge のインテンシティキャリブレーションを始める。
4. キャリブレーションが終了し、“Calibration Verification” ダイアログボックスが表示される。それぞれのチャンネルにつき、“Pass” または “Fail” が表示される。

注：キャリブレーションを行なった後のカートリッジは、標準化面積が 0.004 ~ 0.006 の範囲内に収まっている必要があります。

5. 1 つ以上のチャンネルが “Fail” であった場合、新しい QX Intensity Calibration Marker 溶液を使用して再キャリブレーションを行なう（8 ページの “BioCalculator Software を用いた再キャリブレーション” 参照）。
6. キャリブレーションの初めてのランで、1 つ以上のチャンネルでシグナルが見られなかった場合、英語版 Handbook 41 ページの Appendix D を参照する。
7. 1 つ以上のチャンネルで、バックグラウンドが高い場合は、QIAxcel User Manual あるいは QIAxcel Advanced User Manual の Section 8 を参照する。
8. キャリブレーションが 3 回以上失敗した場合は、キアゲンテクニカルサポート（TEL：03-6890-7300、E-mail：techservice-jp@qiagen.com）にご連絡ください。

BioCalculator Software を用いた再キャリブレーション

注：再キャリブレーションを行なう際は、毎回 QX Intensity Calibration Marker 溶液を新しく分注した Strip をご準備ください。QX Intensity Calibration Marker を再利用するとキャリブレーションデータに悪影響を及ぼし、範囲が外れることがあります。

1. 15 μ l の Intensity Calibration Marker を新しい QX Color 0.2 ml 12-Tube Strip の各チューブにアプライする。気泡のないことを確認して、strip をバッファートレイの MARKER2 の位置にセットする。
2. “Instrument Control” 画面の “File” をクリックして、“Intensity Calibration” を選択し、キャリブレーションウィザードを開始する。
3. キャリブレーションルーチンを繰り返すときは、“Recalibrate” をクリックして、“Start” をクリックする。

サンプル調製

解析に必要なサンプルの最少量は 10 μ l です。解析のためには 0.1 μ l 未満のサンプルが QIAxcel Gel Cartridge にアプライされます。

一般的なサンプル調製法

1. 表 1 に記載されているように、RNA をヌクレアーゼフリー水で希釈する。

注：QX RNA Size Marker 200–6000 nt は希釈せずにそのまま使用できます。

表 1. 推奨する RNA 濃度

RNA サンプルタイプ	推奨する濃度 (ng/μl)	メソッド
トータル RNA	300 ~ 1,000	CM-RNA
	50 ~ 300	CL-RNA
cRNA あるいは一本鎖 RNA	100 ~ 500	CM-RNA
	<100	CL-RNA
断片化した cRNA あるいは cDNA	250 ~ 500	CM-F-RNA

2. RNA サンプル (1 μl、≤1 μg/μl) および QX RNA Size Marker 200–6000 nt (1 μl) を 0.2 ml 12-Tube Strip のチューブに入れる。
3. 等量の QX RNA Denaturation Buffer を添加する。
4. 溶出液をヒートブロックあるいは PCR 装置を用いて 70°C で 2 分間加熱した後、氷上で 1 分間保冷する。
5. スピングダウンして水滴を回収する。
6. QX RNA Dilution Buffer でトータルサンプル量を 10 μl にして、溶液をピペットで数回吸排出して混和する。
7. すぐにサンプルを解析する。

注：解析するサンプル数が 12 未満の場合は、空のチューブに QX RNA Dilution Buffer を入れるかサンプルの塩濃度に類似したバッファーを入れます。空のままで泳動を行なうとキャピラリーが損傷することがあります。

トータル RNA サンプル濃度が 1 μg/μl、cRNA 濃度が 500 ng/μl、あるいは断片化 RNA 濃度が 500 ng/μl より大きい場合は、表 1 にある濃度に希釈してから変性を行ないます。

RNA サンプルをさらに希釈する場合は、2 μl の RNA と変性バッファーを使用します。大量に使用すると異常な泳動やシグナル強度を引き起こすので推奨しません。注入時間が大幅に増加する (20 秒を超える) とピークが広がるので推奨しません。

メソッドの選択

各 QIAxcel Gel Cartridge 用の多数のメソッドがインストール済みです。解析したいサンプルに最適なメソッドを選択するために、表 1、QIAxcel User Manual の Section 5.5 または QIAxcel Advanced User Manual の Section 6.3.3 を参照してください。

プロトコール：QIAxcel ScreenGel Software を用いた RNA の定性／定量解析

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に 3 ページの“重要事項”をお読みください。
- 最適な結果を得るためには、RNA サンプル溶液の pH が約 7～8 になるように調整します。
- サンプルの解析に最適な QIAxcel メソッドを選択してください(9 ページの表 1、QIAxcel User Manual の Section 5.5 または QIAxcel Advanced User Manual の Section 6.3.3 を参照)。
- RNA モードでソフトウェアを起動します。RNA モードに切り替えるには、ソフトウェアをログアウトし、RNA モードでログインします (詳細は 20 ページ、Appendix B 参照)。
- このプロトコールの本ステップは、ルーチンの使用者名でログインされている限りは、デフォルトの RNA QC profile をベースにしています。A12 はサイズマーカーとして指定されています。

実験開始前の準備事項

- 8 ページの“サンプル調製”にある指示に従ってサンプルを調製したことを確認します。
- QIAxcel Gel Cartridge を 2～8℃で保存していた場合は、使用前に QX Cartridge Stand にセットするか、あるいはバッファーを入れたバッファートレイを装置の“Park Position”位置に設置後、QIAxcel Gel Cartridge をセットし、最低 20 分間静置します。
- 3 ページの“QIAxcel Gel Cartridge とバッファートレイの準備”の説明に従って、QIAxcel Gel Cartridge のセットアップと全試薬の調製を行ないます。

操作手順

1. **QIAxcel 装置のスイッチを入れる。**
2. **コンピューターのスイッチを入れ、QIAxcel ScreenGel Software を立ち上げる。**
3. **RNA モードでログインする。**
RNA モードに切り替えるには、ソフトウェアをログアウトし、RNA モードでログインします
4. **QIAxcel Gel Cartridge をセットする。**
詳細は QIAxcel User Manual あるいは QIAxcel Advanced User Manual の Section 5.2.3 を参照してください。

5. **QX RNA Alignment Marker** の入ったバッファートレイをバッファートレイ・ホルダーに入れる。

詳細は QIAxcel User Manual あるいは QIAxcel Advanced User Manual の Section 5.2.2 を参照してください。

注：初めて使用する場合は、QIAxcel Gel Cartridge のキャリブレーションが必要です（6 ページの “QIAxcel ScreenGel Software を用いたインテンシティキャリブレーション” を参照）。

注：QX RNA Alignment Marker は 15 ～ 20 回の泳動を行なうごと、あるいは 3 日ごとのいずれか先行する方に従って交換してください。使用しない場合は QX RNA Alignment Marker の入った 12-Tube Strip を -20°C で保存してください。

6. **Sample strips** もしくはサンプルの入った **96 ウェルプレート** をサンプルトレイホルダーにセットする。

注：QIAxcel 装置の稼働中は、システムの cartridge door と sample door を絶対に開けないでください。稼働中に cartridge door あるいは sample door を開けると、実行されている動作が停止します。

7. **process profile** をプルダウンメニューから選ぶ。

注：Process profile が 1 列目のサンプルの解析とレポートパラメーターのプレセットを実行します。デフォルトのプロセスファイル、あるいはユーザー作製のファイルを使用します。Process profile の作製方法に関しては、19 ページの Appendix A あるいは QIAxcel Advanced User Manual の Section 6.3 をご覧ください。

8. “Next” をクリックして “Sample Selection” タブを開く。

注：“Next” および “Back” は routine user でログインした時のみ表示されます。



次のような情報がこのタブで修正可能です：サイズマーカーとアライメントマーカーの選択と位置、ロット番号情報、自動作製されるプレート ID。

9. “Next” をクリックして “Sample Information” タブを開く。
サンプル情報が入力されます。
10. “Next” をクリックして “Run Check” タブを開き、サンプルとマーカが正しくアプライされたことを確認する。
11. “Run” をクリックして泳動を開始する。



注：選択した process profile のセッティングに従ってレポートが自動的に作製されます。

注：解析セッティングの変更は advanced user により実施することが可能です。

プロトコール：BioCalculator Software を用いた RNA の定性／定量解析

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に 3 ページの“重要事項”をお読みください。
- 最適な結果を得るためには、RNA サンプル溶液の pH が約 7～8 になるように調整します。
- サンプルの解析に最適な QIAxcel メソッドを選択してください（9 ページの表 1 または QIAxcel User Manual の Section 5.5 を参照）。
- QIAxcel 装置での RNA メソッドは normal あるいは RNA モードで BioCalculator Software を用いて行なえます。ラン後の自動化解析を含む RNA データの解析（15 ページのステップ 14）には、ソフトウェアを RNA モードで作動します。RNA モードに切り替えるには、“Instrument Control”画面と開いているデータファイル全てを閉じます（詳細は 20 ページの Appendix B 参照）。

実験開始前の準備事項

- 8 ページの“サンプル調製”にある指示に従ってサンプルを調製したことを確認します。
- QIAxcel Gel Cartridge を 2～8℃で保存していた場合は、使用前に QX Cartridge Stand にセットするか、あるいはバッファーを入れたバッファートレイを装置の“Park Position”位置に設置後、QIAxcel Gel Cartridge をセットし、最低 20 分間静置します。
- 3 ページの“QIAxcel Gel Cartridge とバッファートレイの準備”の説明に従って、QIAxcel Gel Cartridge のセットアップと全試薬の調製を行ないます。

操作手順

1. QIAxcel 装置のスイッチを入れる。
2. コンピューターの電源を入れ、BioCalculator Software を立ち上げる。
3. オプション：RNA モードに切り替える。
4. QIAxcel Gel Cartridge をセットする。
詳細は QIAxcel User Manual の Section 5.2.3 を参照してください。

5. **QX RNA Alignment Marker** の入ったバッファートレイをバッファートレイ・ホルダーに入れる。

詳細は QIAxcel User Manual の Section 5.2.2 を参照してください。

注：初めて使用する場合は、QIAxcel Gel Cartridge のキャリブレーションが必要です（7 ページの “BioCalculator Software を用いたインテンシティキャリブレーション” を参照）。

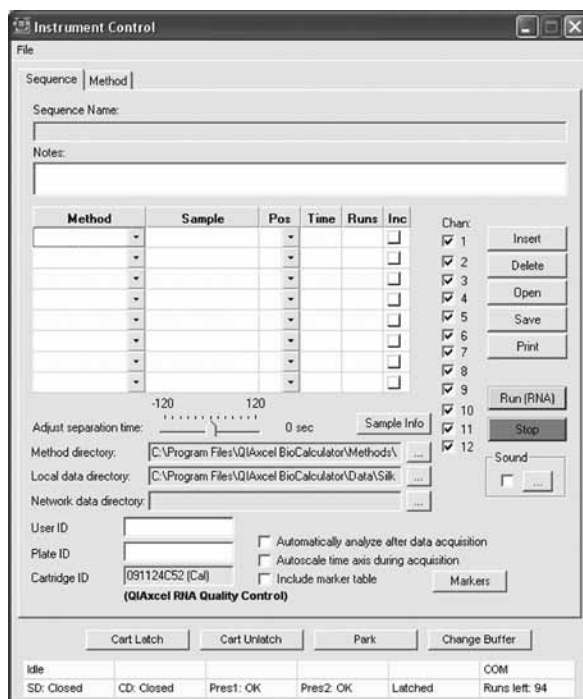
注：QX RNA Alignment Marker は 15 ～ 20 回の泳動を行なうごと、あるいは 3 日ごとのいずれか先行する方に従って交換してください。使用しない場合は QX RNA Alignment Marker の入った 12-Tube Strip を -20°C で保存してください。

6. **Sample strips** もしくはサンプルの入った **96 ウェルプレート** をサンプルトレイホルダーにセットする。

注：QIAxcel 装置の稼働中は、システムのカリッジドアあるいは sample door を絶対に開けないでください。稼働中に cartridge door あるいは sample door を開けると、実行されている動作が停止します。

7. “Instrument Control” 画面から使用する電気泳動メソッドを選ぶ。

インストール済みのメソッドに関しては、9 ページの表 1 または QIAxcel User Manual の Section 5.5 を参照してください。



8. サンプル名、サンプルのプレート位置、電気泳動回数を“Instrument Control”の関連するフィールドに入力する。
9. オプション：“Time”欄でサンプル注入時間の設定をする（最小：5s、最大：40s）。

“Time”欄が未入力の場合は初期設定値が適用されます。
10. 同じ列のサンプルのマルチプレックス解析を行なうためには、“Runs”に泳動の実施（反復）回数を入力し、“Inc”のチェックを外したままにする。

同じメソッドで96ウェルプレートで実行する場合は“Inc”にチェックを入れ、“Runs”に8を入力します。
11. データが保存されるディレクトリのパスを **data directory** で指定する。

注：オプションで User ID と Plate ID を入力すると、data directory の下にサブフォルダーが作成されます。

オプション：コンピューターをネットワークに接続している場合は、local data directory だけでなく、network directory に run data を保存できます。
12. 推奨：“Sample Info”をクリックして個々のウェルのサンプル情報を入力する。

また、スプレッドシートに入力されているサンプル情報は、*.csv (comma-separated value) ファイル形式でインポートすることもできます。
13. 使用するチャンネルを有効にする（チャンネルを全部使用しない場合には、使用するチャンネルだけに、チェックを入れる）。

注：未使用のウェルには QX RNA Dilution Buffer を入れて、チャンネルへの損傷を防ぎます。
14. オプション：“Automatically analyze after data acquisition”にチェック、“Include reference marker table”にチェック、“Marker”をクリックして必要な RNA リファレンスマーカーを開く。

このオプションにチェックが入っていると、解析は既存のリファレンスマーカーテーブルからリファレンスマーカーデータを使用して行なわれます。

注：データ収集の後 RNA 自動解析を行なうためには、ソフトウェアは RNA モード（20 ページ、Appendix B）でなければなりません。
15. **Status Panel** で **QIAxcel** システムの状態をチェックする。

Cartridge door (CD) と sample door (SD) を閉じていることを確認してください。

注：“Status Panel”は“Instrument Control”画面の一番下にあり、QIAxcel システムの状態を表示します（詳細は QIAxcel User Manual の Section 5.3 を参照）。
16. “Run”をクリックして泳動を開始する。

泳動が始まると、エレクトロフェログラムとゲルイメージ画面が現れます。

トラブルシューティング

このトラブルシューティングは、トラブルが発生したときの問題解決に使用してください。さらに、QIAxcel User Manual および QIAxcel Advanced User Manual、および QIAxcel ScreenGel Software と BioCalculator ソフトウェアの“Help”メニューには広範なユーザー情報が記載されています。詳細は弊社ウェブサイトのテクニカルサポートページ、“Frequently Asked Questions”内 (www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx) でご覧いただけます。このハンドブックに掲載されているプロトコール、あるいは分子生物学への応用などに関する質問に対しては、テクニカルサポート (TEL : 03-6890-7300、E-mail : techservice-jp@qiagen.com) にお気軽にお問い合わせください。

コメント

フラグメントサイズが正確でない

- a) リファレンスマーカー
テーブルのデータが
有効でない
- サイズマーカーの入ったレーンを正しく選んだこと、全フラグメントが正確に同定されていることを確認する (QIAxcel ScreenGel Software)。
- マーカーテーブルの泳動時間とピーク面積データをアップデートするために“Fill”を使用する際は、リファレンスマーカーチャンネルがアクティブ画面になっていることを確認する (BioCalculator Software)。
- リファレンスマーカーテーブルが 8 フラグメントすべてのデータを全て含んでいることを確認する。そうでない場合はファイルからマーカーテーブルをリロードするかデフォルトのリファレンスマーカーテーブルを使用する。
- b) リファレンスマーカー
チャンネルに
アーティファクト
- リファレンスマーカーチャンネルのアーティファクトはピークの正確な同定を妨害する場合がある。この場合、他のランからのリファレンスマーカーテーブルを使用するかランを繰り返す。
- QIAxcel ScreenGel Software を用いてアーティファクトなピークをマニュアルで取り除くことが可能。
- c) リファレンスマーカー
あるいは RNA サンプル
が変性されていない
- 7 ページの“BioCalculator Software を用いたインテンシティキャリブレーション”にある指示に従って全サンプルを変性したことを確認する。

コメント

- d) リファレンスマーカーデータが有効でない
- リファレンスマーカーテーブルのデータが最新でない場合（例えば異なるカートリッジのもの、あるいは5～10以上前のランのもの）、泳動時間が現在のランとは一致しないことがある。
- QIAxcel gel cartridge を再使用する場合は少なくとも5～10 ランごとにリファレンスマーカーを新しくする。また新しい QIAxcel Gel Cartridge を初めて使用する度にリファレンスマーカーを新しくする。

リボゾーム RNA のピークが正しく同定できない

- リファレンスマーカーテーブルのセッティングが正しくない
- 20 ページの Appendix B に記載されているように alignment marker、18S と 28S ピークをマニュアルで同定する。

推定した RNA 濃度が正しくない

- a) カートリッジが校正されていない
- 6 ページの “インテンシティキャリブレーション” に記載されているように各カートリッジを校正する。
- b) サンプル中の塩濃度
- サンプル中の塩濃度は注入効率と RNA 泳動に影響する。
- 沈殿法を用いたプロトコールで分離した RNA ペレットは、スピンカラム（例；RNeasy® MinElute® Cleanup Kit、Cat. no. 74204）により慎重に洗浄、あるいは追加のクリーンアップが必要になる。
- c) RNA サイズマーカーの量が正しくない
- RNA サイズマーカーが部分的に分解されている、あるいはシグナルが通常より弱い場合、RNA 濃度を過大評価することになる。新しい RNA サイズマーカーを使用する。
- 1 μ l を超える RNA を分離する場合は、濃度を適宜調節する。

1 個以上のチャンネルが results テーブルに表示されない

- a) サイズマーカーに選んだチャンネルが間違っている
- BioCalculator Software を使用する場合は、サイズマーカーの入ったチャンネルを、リファレンステーブルのプルダウンメニューから正しく選んだことを確認する（20 ページ、Appendix B 参照）。

コメント

- b) 同時に解析したランで、異なる位置にサイズマーカーがある
- QIAxcel ScreenGel Software を使用する場合は、各バッチのサイズマーカー・レーンは process profile で選択される。
- BioCalculator Software を使用する場合は、リファレンスマーカーテーブルのプルダウンリストから選んだサイズマーカーが、解析に含まれる全てのランの results テーブルから省かれた。全チャンネルを含めるために、プルダウンメニューから “N/A” を選ぶ。全 results テーブルからサイズマーカー欄を無視する (サイズマーカーのフラグメントが rRNA フラグメントとして間違えて認識される)。

Appendix A : QIAxcel ScreenGel Software を用いた Process Profile 作製

注：“Advanced User”として登録されているユーザーのみが新しい Process Profile を作製できます。

新しい Process Profile を作製するためには、以下に従ってください：

A1. “Process” 環境を開く。

開かない場合は、“Process” アイコンをクリックして “Process” 画面に切り替えます。“Process Profile” 画面を選びます。

新規 Process Profile を作製するための主なステップ

注：最後のプロセスが終わったら右下の “Back to Wizard” をクリックします。

A2. プルダウンメニューから RNA cartridge type を選ぶ。

注：装置が接続していれば、システムは自動的に挿入済みの cartridge を検出し、cartridge type の変更はできません。

A3. process profile を選ぶ。

必要な process profile をプルダウンメニューから選ぶ。新しい Process Profile 作製用テンプレートとして、選んだ process profile が作動する。

注：最初から process profile を作製するためには“NewProcessProfile”を選びます。その後、システムが“*NewProcessProfile”を呈示します。これは“Advanced User”として登録されているユーザーによってのみ行なえます。

A4. ニーズに応じて process profile のオプションをセットする。

詳細は QIAxcel Advanced User Manual の Section 6.3.3 を参照してください。

A5. 修正を入れた process profile に新しい名前をつけて保存する。

プロセスセットアップ下の“Save Process Profile as...”をクリックして、現れた“Save Profile”ダイアログボックスに新規の profile 名を入力する。

注：これは“Advanced User”として登録されているユーザーによってのみ行なえます。

注：不完全あるいは矛盾したデータは process profile 画面で黄色くハイライトされ、“Save process profile as...”ボタンは機能しません。マークされている process profile screen を選んでデータを修正してください。すべてのデータが正確に入力されると“Save process profile as...”ボタンが機能し、process profile の保存が可能です。

Appendix B : データ解析

QIAxcel ScreenGel Software を用いたデータ解析

process profile の解析オプションが作動した場合は、QIAxcel ScreenGel Software によりデータの自動解析とアライメントが行なわれます。Advanced あるいは Basic user としてログインしている場合は、マニュアルでの補正も可能です。

解析を開始する前に、変更箇所を保存、ログアウト、RNA モードで再びログインすることにより、QIAxcel ScreenGel Software が確実に RNA モードになっていることを確認します。

初めてゲルカートリッジを使用する場合は、1 つ以上のキャピラリーに QX RNA Size Marker 200–6000 nt を入れることを推奨します。サイズマーカーのデータは次のランで使用できますが、各ランにマーカーが含まれている場合は、サイズと濃度の解析はより正確になります。

泳動後、ゲルイメージが解析環境で表示されます。各チャンネルのデータは、electropherogram view を選択して切り替えることで表示できます。

RNA サンプルの解析はシングルステップで行なわれます。生データでピーク検出後、サンプルとリファレンスマーカーの比較によりピークの位置と濃度が決まります。

操作手順

- B1. “Experiment Explorer” を用いて解析するためにサンプルをロードする。
- B2. サイズマーカーがランに含まれている場合は、24 ページの “QIAxcel Screen-Gel Software” を用いて RNA リファレンスマーカーを作製” に記載されているとおり新しいリファレンスマーカーを作成する。
- B3. ゲルイメージ画面で解析するサンプルを選ぶ。

The screenshot shows the QIAxcel Screen-Gel Software interface. The main window is titled "Gel Image" and "Electropherogram". The "Reference Marker" tab is active, showing a gel image with lanes A1 through A6. The y-axis represents size in [bp/nt] with markers at 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500, and 200. The x-axis represents lanes A1 through A6. Below the gel image, there are controls for RFU, Contrast, and Noise Cutoff. A table below the gel image lists samples and their properties.

The "Reference marker" configuration panel on the right shows the following settings:

- Reference marker: Reference Marker Table
- Table name: *C100807C99_2019-07-19_11-16-01
- Marker Table:

Ret.	NA	Size [nt]	Conc. [ng/µl]
1.0000	--	15	--
1.2969	0.015755	200	60.00
1.5602	0.018532	500	60.00
1.8547	0.019132	1000	60.00
2.0550	0.016926	1500	60.00
2.2250	0.015791	2000	60.00
2.4803	0.017439	3000	60.00
2.6942	0.012747	4000	60.00
3.0693	0.007655	6000	60.00

Below the marker table, there are settings for "Time Align. Marker" (Est. Time: 2.44 min, Tolerance: 5%) and "16 S Size" (Size: 1869 nt, Est. Rel. Time: 2.180, Tolerance: 3%) and "28 S Size" (Size: 5025 nt, Est. Rel. Time: 2.896, Tolerance: 4%). At the bottom, it shows "12 Sample(s) selected" and a "Start Analysis" button.

B4. “Analysis” タブを開き、サンプルの解析に使用するリファレンスマーカーを選ぶ。

注：新しく作製されたリファレンスマーカーが選択されています。“Reference marker” で “Reference Marker Table” を選び、較正済みのリファレンスマーカーを選びます。リファレンスマーカーの詳細はマーカーテーブルに表示されます。

注：リファレンスマーカーテーブルが見えない場合は、“View” メニュー（メニューアイテムの “View” / “Show Analysis Parameters” を選択）を用いるか、あるいは view selection bar の一番右端にあるアイコンをクリックして表示することが可能です。

注：確実に解析するために、サンプルのアライメントマーカーに一致するリファレンスマーカーテーブルがある場合のみに、“Reference Marker” ブルダウンリストが使用可能です。一致するリファレンスマーカーテーブルが無い場合は、新しいリファレンスマーカーを作成できます（24 ページの “QIAxcel Screen-Gel Software を用いて RNA リファレンスマーカーを作製” 参照）。

注：RNA モードでは、解析特性はリファレンスマーカーを作製するためのサイズマーカーサンプルの解析にのみ影響します。その他のサンプルは特別なパラメーターを固定した RNA アルゴリズムにより解析されます。

B5. “Start Analysis” タブをクリックして解析を開始する。

解析結果が result テーブルと “Single Electropherogram View” に表示されます。

B6. ゲルイメージあるいはエレクトロフェログラム一覧の下にある result テーブルを調べて、解析した全サンプルに関してフラグメントが検出されていることを確認する。

注：予想（相対）時間とリファレンスマーカーで定義された tolerance を用いて、アライメントマーカー 18S および 28S のピークが検出されます。マニュアルでピークを同定することも可能です（次ページの “マニュアルによるピーク同定” 参照）。同定されないピークがある場合は、18S : 28S 比は計算されません。

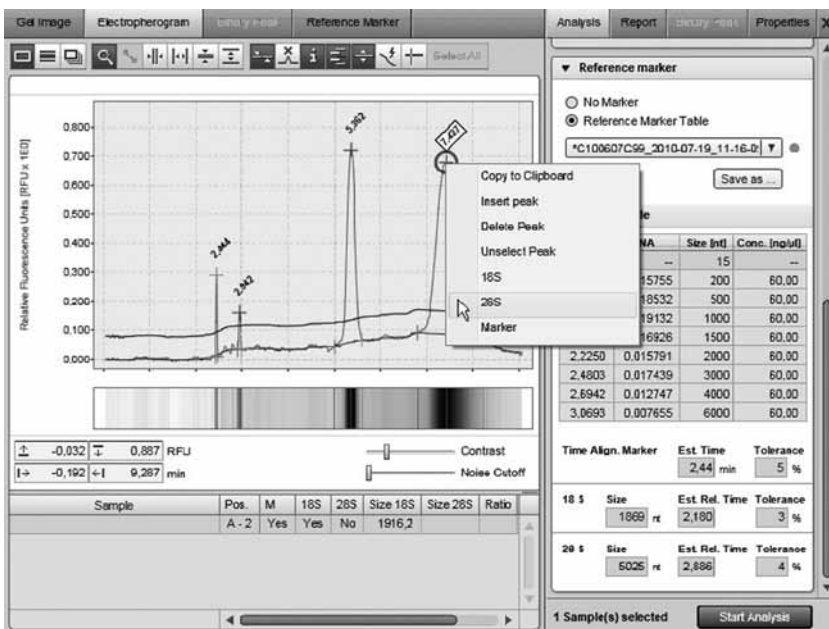
B7. “Experiment Explorer” の “Save” ボタンをクリックして解析結果を保存する。

マニュアルによるピーク同定

アライメントマーカースとリファレンスマーカーの 18S あるいは 28S フラグメントの泳動時間は、“Single Electropherogram View” のコンテキストメニューを用いてサンプルごとに変更可能です。

- B1. “Experiment Explorer” で使用するサンプルをクリックする。
- B2. “Single Electropherogram View” に移る。
- B3. エレクトロフェログラムで泳動時間の変更が必要なピークを右クリックする。コンテキストメニュー中の“18S”、“28S”、“Marker”のいずれかを選ぶ。リファレンスマーカーの対応する時間が、選んだピークの相対時間で更新される。更新したい時間に関して全て、このステップを繰り返す。

注：更新したリファレンスマーカーを以後の実験でも使用する場合は、“Analysis”パラメーターページの“Reference Marker”で“Save as...”ボタンをクリックして再度保存します。



- B4. サンプルの result テーブルを更新するために、“Start Analysis” ボタンをクリックして再解析する。

全サンプルの result テーブルを更新するために、“Gel Image” あるいは “Electropherogram Overview” に切り替える。この画面で更新したいサンプルを選ぶ。“Start Analysis” ボタンをクリックしてこれらを再解析する。選択したサンプルの結果欄が更新される。

QIAxcel ScreenGel Software を用いて RNA リファレンスマーカーを作製

新しいリファレンスマーカーを作製するために、ピーク時間と面積の注釈入りのサイズマーカー解析が必要です。サイズマーカーデータのピークをサイズマーカーテーブル(アライメントマーカーを含む)と一致させることでリファレンスマーカーが作製されます。

B1. “Experiment Explorer”で、サイズマーカーチャンネルを選ぶ。チャンネルが“Size Marker”として表示されない場合は、サイズマーカーチャンネルを右クリックして、表示されるコンテキストメニューから“Size Marker”を選ぶ。

B2. “Single Electropherogram View”のサイズマーカーチャンネルを開く。

B3. “Analysis”タブにある“Analysis Properties”の解析プロファイルを選択するか、新しい解析プロファイルのデフォルトのパラメーターを使用する。

リファレンスマーカーテーブルが見えない場合は、“View”メニュー(メニューアイテムの“View”/“Show Analysis Parameters”)を用いるか、view selection barの一番右端にあるアイコンをクリックして表示することが可能です。

B4. “Reference Marker”から“No Marker”を選択する。

B5. “Start Analysis”ボタンをクリックして解析を開始する。

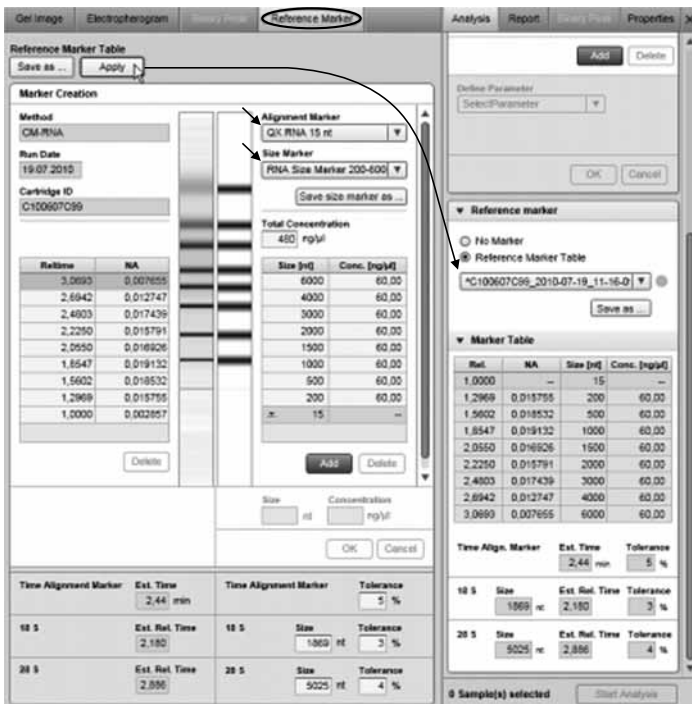
解析結果は、マークしたピークをもつサンプルです。

B6. ピークが正確に検出されていることを確認する。必要な場合には、“Insert Peak”および“Delete Peak”オプションで較正する。

注:ベースラインが増加した(threshold lineの増加が起きる)ためにサイズマーカーピーク(通常は最後)が検出されない場合は、ベースラインが平坦になるまで“Baseline Filter”の“Window”パラメーターを増やすか、“Pos. threshold”パラメーターを減らします。ピークショルダーに副産物のピークが間違えて検出された場合は、“Delete Peak”オプションで不正確なピークを除去します。

B7. “Reference Marker”タブを開き、使用したアライメントおよびサイズマーカーを選ぶ。

実際のゲル(左)と理論上のリファレンスマーカーゲルの比較が表示されます。



B8. オプション：アライメントマーカーと 18S / 28S フラグメントの検出用 tolerance を決める。フラグメントの予想されるサイズが変更される。

注：サンプルピークを用いたサンプル解析中に、予想されたサイズを変更することが可能です。

サイズマーカー中のピーク数とリファレンスマーカーのピーク数が一致すると、リファレンスマーカーはサンプル解析に使用できます。

B9. リファレンスマーカーを作成した後、“Apply” ボタンをクリックして、“Analysis” タブの “Reference Markers” にこれをコピーする。

“Save as...” ボタンをクリックして、次の泳動にリファレンスマーカーを保存することができます。

注：リファレンスマーカーが無効である場合（例えばリファレンスとサイズマーカーのピーク数が一致しない場合）は、“Apply” および “Save as...” ボタンは使用できず、警告がページ上に発せられます。予想より多いピークがサイズマーカー中に検出された場合は、“Delete” オプションを用いて過剰なピークを削除可能です。あるいは、“Single Electropherogram View” に切り替えて、ステップ 6 からの操作を繰り返します。

BioCalculator Software を用いたデータ解析

RNA 解析を開始する前に、BioCalculatorSoftware が RNA モードであることを確認してください。RNA モードがアクティブの場合はソフトウェア画面の名前は“BioCalculator (RNA)” になります。

RNA モードを選択するためには、すべてのデータファイルを閉じて、“Analysis”メニューから“RNA”を選択し（図 2）、解析用のデータファイルをもう一度開いてください。データファイルが開いている状態では、DNA モードから RNA モードへの変更あるいはこの逆の変更はできません。

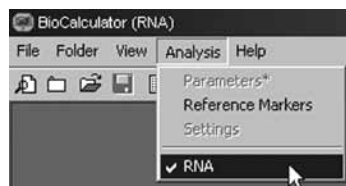


図 2. BioCalculator ソフトウェアの RNA モードへの切り替え

ゲルカートリッジを初めて使用する場合は、少なくとも 1 つのキャピラリーに QX RNA Size Marker 200–6000 nt を入れることを推奨します。サイズマーカーのデータは次のランで使用できますが、各ランにマーカーを入れることによってサイズと濃度の解析がより正確になります。

解析が終了すると“Folder View”（図 3）画面上には、ゲルイメージ、全チャンネルのデータと RNA 関連の測定データが表示されます。個々のチャンネルのデータは、ゲルイメージのチャンネルをダブルクリックするか、右側のリストからチャンネルを選ぶことにより開くことができます。

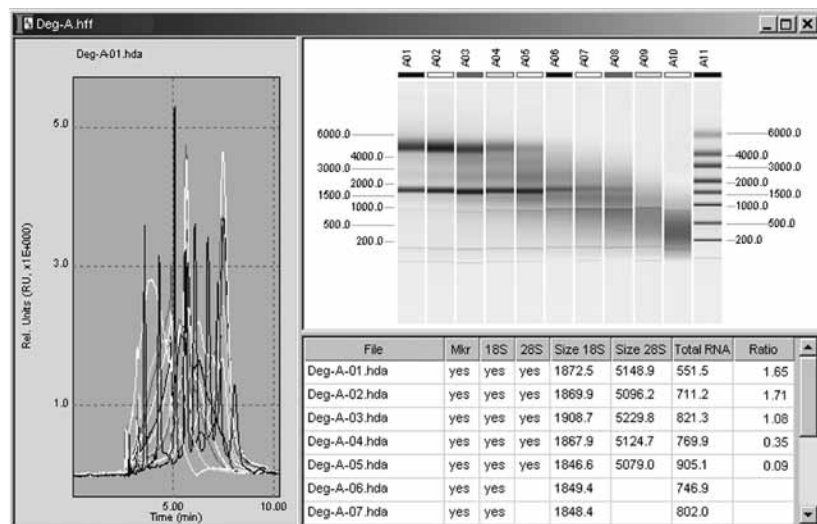


図 3. “Folder View”

操作手順

- B1.** オプション：ゲルイメージのチャンネルをダブルクリックするか、右側のリストからチャンネルを選ぶことにより RNA サイズマーカーの入ったチャンネルを開く。

注：解析するランに RNA サイズマーカーが入っていない場合は、ステップ B2 に進んでください。前回のランからのサイズマーカーデータが使用されます。

- B2.** BioCalculator メニューバーの “Analysis”、次に “Reference Markers” を選択する。

“Reference Markers” ダイアログボックスが開きます。

- B3.** “Open” をクリックしてファイルからサイズマーカーテーブルを読み込む。あるいは前回のランでデフォルトとして設定したサイズマーカーを読み込むために “Load Default” をクリックする。

“Set As Default” および “Load Default” によりリファレンスマーカーテーブルの設定がラン間で保存されます。別のファイルに保存する必要はありません。

The screenshot shows the "RNA Reference Markers" dialog box. It contains a table with columns: Size, Norm Loc, Norm Area, and Conc. The table lists markers at sizes 200, 500, 1,000, 1,500, 2,000, 3,000, 4,000, and 6,000. To the left of the table are input fields for Migration time and Tol (%) for the Alignment Marker (2.33, 5), and Norm. Loc and Tol (%) for 18S (2.09, 3) and 28S (2.75, 4). There is a dropdown for Size marker lane (N/A) and a checked checkbox for "Apply to all documents/folders". Buttons include "Set As Default", "Load Default", "Clear", "Fill", "Open", "Save", "OK", and "Cancel".

Size	Norm Loc	Norm Area	Conc
200	1.264	0.027	60
500	1.497	0.03	60
1,000	1.791	0.031	60
1,500	1.991	0.028	60
2,000	2.159	0.026	60
3,000	2.402	0.028	60
4,000	2.627	0.019	60
6,000	3.06	0.01	60

- B4.** プルダウンメニューから size marker channel を選ぶ。選んだマーカーが results テーブルから排除される。

注：いくつかのラン（12 バッチ）からのデータを同時に解析し、ランで使用されているサイズマーカーの位置が異なる場合は、プルダウンメニューから “N/A” を選んでください。

- B5.** オプション：現在開いているチャンネルからマーカーテーブルにサイズマーカーデータ（ピークの位置および面積）を読み込む場合は、“Fill” をクリックする。

注：解析するランに RNA サイズマーカーが入っていない場合は、ステップ B6 に進んでください。前回のランからのサイズマーカーデータが使用されます。

- B6.** “Apply to all documents/folders” にチェックを入れ、“OK” をクリックして、解析を開始する。

- B7.** folder view に切り替える。

- B8.** ゲルイメージの下の **results** テーブルで、**18S** および **28S alignment marker** が各チャンネルで同定されていたかどうかチェックする。

同定されていた場合は、対応するセルに “yes” と表示される。そうでない場合はマニュアルで同定し、解析を繰り返す（以下のステップ B9 ~ 11）。

- B9.** 全ピークが正確に同定されると、解析が完了する。1 つ以上のピークが正確に同定されていない場合は、トータル RNA の入ったチャンネルの一つを選ぶ。エレクトロフェログラムのアライメントマーカーのピークを右クリックして、プルダウンメニューから “**Marker**” を選ぶ。

- B10.** マニュアルで同定するために **18S** および **28S** のピークを右クリックする。

- B11.** リファレンスマーカーテーブルを開き、データを再び解析するために “**OK**” をクリックする。シングルチャンネルからのデータを解析するために、“**Apply to all documents/folders**”（のチェック）を外す。

異なるパラメーターを持つチャンネルが同時に解析できない場合に（例えば、異なる種からの RNA を同一ランで解析する場合）、マニュアル較正の後でのみこのステップが必要になります。

18S および 28S rRNA の泳動時間が 1 つのラン内で顕著に異なる場合は、同定を改良するためにリファレンスマーカーテーブルの “**Tol (%)**” 値を調節します：しかし tolerance% 値が高いとピークの誤認が生じることがあります。

解析が終了すると、データテーブルには算出したヌクレオチドのリボソーム RNA のフラグメントサイズが表示され、算出されたトータル RNA の濃度 (ng/ μ l) と 28S/18S rRNA の割合が表示されます。

注：異なるカートリッジでは泳動時間がわずかに変動するため、新しいカートリッジごとにリファレンスマーカーテーブルを保存することを推奨します。

注：1 μ l を超える RNA をサンプルチューブに添加した場合、あるいは測定前に RNA を希釈した場合は、RNA 濃度を算出する際に適宜較正してください。

— Memo —

— Memo —

Trademarks: QIAGEN®, QIAxcel™, RNeasy®, MinElute® (QIAGEN Group).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載の QIAGEN 製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2008–2011 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒 104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel: 03-6890-7300 ■ Fax: 03-5547-0818 ■ E-mail: techservice-jp@qiagen.com

