

GenFind V2

クイックマニュアル



本クイックマニュアルは簡易版です。使用前には、正式なマニュアル(英文)を必ずご一読ください。

Introduction

ベックマン・コールターのスリッドフェーズ可逆的固定化 (SPRI) 磁性ビーズ技術により、血液 (凍結/非凍結の、抗凝固剤入り全血/血清) からの DNA 抽出に対応します。本プロトコルでは全血/血清 200 μ L をサンプルとして 96 ウェルプレートを用いた抽出方法、および全血/血清 400 μ L をサンプルとして 2 mL チューブを用いた抽出方法を解説します。

適用アプリケーション

アガロースゲル解析、PCR、制限酵素処理、メンブレン上でのハイブリダイゼーション解析 (サザンブロット・ドットブロットなど)、AFLP・RFLP・RAPD・マイクロサテライト・SNP を用いたジェノタイプング/フィンガープリンティング解析

保存方法

Lysis LBC	室温保存
Proteinase K	-20°C 保存
Proteinase K Buffer	室温保存
Bind BBB	4°C 保存
Wash BBB	室温保存
Wash BBC	室温保存

本マニュアルの対応製品

A41499 GenFind V2 50 preps

A41497 GenFind V2 384 preps

Material Supplied by the User

96 ウェル反応プレートの場合

1.2 mL 96 ウェルプレート

例: Thermo Fisher Scientific, AB-1127

プレート用のシール

例: Thermo Fisher Scientific, AB-0558

Beckman Coulter SPRIPlate 96R Ring Super Magnet Plate, A32782

2 mL チューブの場合

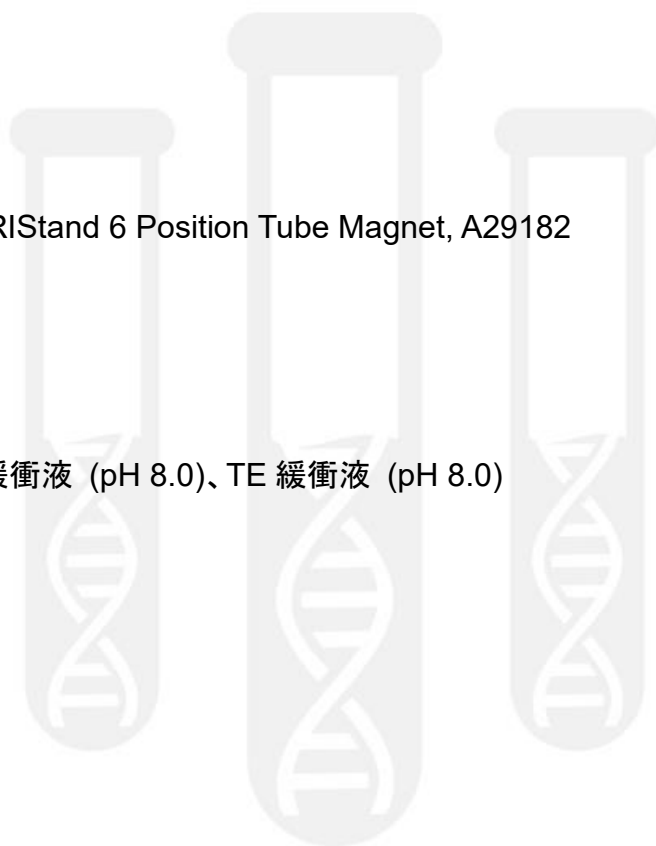
2 mL マイクロチューブ

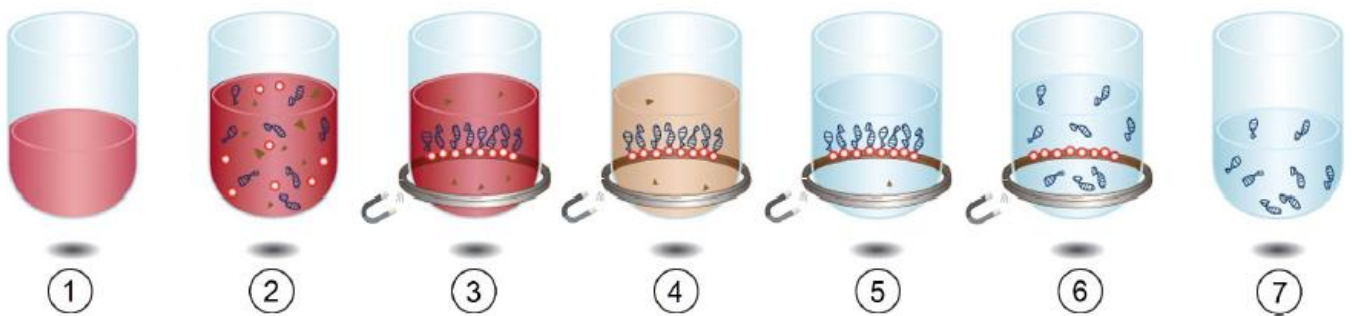
Beckman Coulter SPRIStand 6 Position Tube Magnet, A29182

試薬

100%エタノール

溶出液: 滅菌水、Tris 緩衝液 (pH 8.0)、TE 緩衝液 (pH 8.0)



Quick Reference (全血/血清 200 μ L、96 ウェル反応プレートの場合)

1. 全血・血清サンプル 200 μ L、Lysis LBC 400 μ L、Proteinase K 溶液 9 μ L をピペッティング 10 回により混合し、37°Cで 10 分間、または室温で 30 分間反応。
2. Bind BBB 300 μ L を加え、ピペッティング 10 回により混合し、室温で 5 分間静置。
3. 磁気プレート上で 15 分間静置後、上清を除去。
4. 磁気プレートから下ろし、Wash WBB 800 μ L を加え、ピペッティング 10 回で再懸濁。磁気プレート上で 10 分間静置し、上清を除去。この Wash WBB 洗浄を再度繰り返す。
5. 磁気プレートから下ろし、Wash WBC 溶液 500 μ L を加え、ピペッティング 10 回で再懸濁。磁気プレート上で 6 分間静置し、上清を除去。この Wash WBC 溶液洗浄を再度繰り返す。
6. 磁気プレート上で、全血サンプルの場合は溶出液 200 μ L、血清サンプルの場合は溶出液 40 μ L を添加。磁気プレートから下ろし、ピペッティングで十分に再懸濁し、室温で 2 分間静置により DNA を溶出。磁気プレート上で 10 分間静置。
7. 溶出 DNA を保存用プレートに移す。全血サンプルの場合は、溶出液のうち 25 μ L を元のプレートに残す。

Purification Procedure

全血/血清 200 μ L 以下、96 ウェル反応プレートでの実験手順

凍結または非凍結の、凝固剤入り全血または血清の血液サンプルに対応します。凍結サンプルは、室温または 37°C で解凍し、十分に転倒混和します。

1. 96 μ g/ μ L Proteinase K 溶液と Wash WBC 溶液を調製します。

Proteinase K のボトルに Proteinase K Buffer を、ラベルに記載された容量加え、混合します。調製後の溶液は、-20°C で保存します。

Wash WBC のボトルに 100%エタノールを、Wash WBC : 100%エタノール = 1 : 3 の割合で加え、混合します。調製後の溶液は、室温で保存します。

2. 血液サンプルを数回転倒混和します。ピペッティングやボルテックスで攪拌は推奨しません。200 μ L 以下の血液サンプルを 1.2 mL ウェルサイズの 96 ウェル反応プレートに入れます。

3. Lysis LBC 400 μ L (200 μ L の場合; サンプルの 2 倍容) と Proteinase K (96 μ g/ μ L) 溶液 9 μ L (200 μ L の場合; サンプルの 0.045 倍容) とを加え、ピペッティング 10 回により泡立たないように混合します。

4. 反応プレートに封をして、37°C で 10 分間、または室温で 30 分間反応します。

5. Bind BBB のボトルを 20 回以上攪拌し、ビーズを完全に再懸濁します。Bind BBB 300 μ L (200 μ L の場合; サンプルの 1.5 倍容) を加え、ピペッティング 10 回により混合します。磁性ビーズと DNA を結合するステップです。ピペッティングは泡立たないようにゆっくりと行ってください。気泡は磁性ビーズと DNA の結合を阻害し、収量を低下させます。

6. 反応プレートを室温で 5 分間静置し、DNA をビーズに結合します。

7. 反応プレートを磁気プレート上で 15 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。

8. 反応プレートが磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
磁性ビーズが見えづらい場合には、ウェル底の中心部にチップを差し入れて、リング状の磁性ビーズを乱さないように上清を除去します
9. 反応プレートが磁気プレートから下ろし、Wash WBB 800 μL (200 μL の場合; サンプルの 4 倍容) を加えます。ピペティング 10 回により磁性ビーズを十分に再懸濁します。
10. 反応プレートが磁気プレート上で 10 分間または上清が透明になるまで静置し、溶液中のビーズを分離します。
11. 反応プレートが磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
12. ステップ 9~11 の Wash WBB 洗浄を再度繰り返してください。
13. 反応プレートが磁気プレートから下ろし、Wash WBC 溶液 500 μL (200 μL の場合; サンプルの 2.5 倍容) を加えます。ピペティング 10 回により磁性ビーズを十分に再懸濁します。
14. 反応プレートが磁気プレート上で 6 分間静置し、溶液中のビーズを分離します。
15. 反応プレートが磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
16. ステップ 13~15 の Wash WBC 溶液洗浄を再度繰り返してください。
17. 反応プレートが磁気プレート上に置いたままで、プレートの底や壁についた水滴をピペットで吸い取るなどして、Wash WBC 溶液を可能な限り除去します (必要に応じて 5 分間風乾します)。全血サンプルの場合は溶出液 200 μL 、血清サンプルの場合は溶出液 40 μL を入れます。
高濃度の DNA を得たい場合には、溶出液量を少なくすることが可能です。洗浄後の磁性ビーズを過度に乾燥すると、DNA が溶出しづらくなる場合があります。

18. 反応プレート[®]を磁気プレートから下ろし、ピペッティングにより磁性ビーズを十分に再懸濁し、室温で2分間静置します。完全にDNAを溶出するため、ピペッティングにより磁性ビーズを再度懸濁します。

19. 反応プレート[®]を磁気プレート上で10分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。溶出DNAを含む上清を、新しい保存用プレートまたはチューブに移します。

全血サンプルの場合は、溶出液25 μL を元の反応プレートに残すようにします。血清サンプルの場合は、溶出液を元の反応プレートに残す必要はありません。磁性ビーズが混入した場合には、元の反応プレートに溶液を戻し、ステップ19をやり直してください。

血清サンプルの場合には、溶出液40 μL のうち2 μL 以上をPCRに使用すると、良好な結果が得られます。



全血/血清 400 μ L 以下、2 mL チューブでの実験手順

凍結または非凍結の、凝固剤入り全血または血清の血液サンプルに対応します。凍結サンプルは、室温または 37°C で解凍し、十分に転倒混和します。

全血/血清 400 μ L をサンプルとする場合には、2 mL チューブを使用してください。1.7 mL チューブを使用する場合には、サンプル量を 300 μ L にしてください。

1. 96 μ g/ μ L Proteinase K 溶液と Wash WBC を調製します。

Proteinase K のボトルに、Proteinase K Buffer を 50 preps、384 preps いずれの場合も 1 mL 加え、混合します。調製後の溶液は、-20°C で保存します。

Wash WBC のボトルに、100%エタノールを 50 preps の場合は 105 mL、384 preps の場合は 375 mL 加え、混合します (Wash WBC と 100%エタノールを、1 : 3 の割合で混合)。調製後の溶液は、室温で保存します。

2. 血液サンプルを数回転倒混和します。ピペッティングやボルテックスで攪拌は推奨しません。

400 μ L 以下の血液サンプルを 2 mL マイクロチューブに入れます。

3. Lysis LBC 800 μ L (400 μ L の場合; サンプルの 2 倍容) と Proteinase K (96 μ g/ μ L) 溶液 18 μ L (400 μ L の場合; サンプルの 0.045 倍容) とを加え、ピペッティング 10 回により泡立たないように混合します。

4. チューブのキャップを閉め、37°C で 10 分間、または室温で 30 分間反応します。

5. Bind BBB のボトルを 20 回以上攪拌し、ビーズを完全に再懸濁します。Bind BBB 600 μ L (400 μ L の場合; サンプルの 1.5 倍容) を加え、ピペッティング 10 回によりに混合します。磁性ビーズと DNA を結合するステップです。ピペッティングは泡立たないようにゆっくりと行ってください。気泡は磁性ビーズと DNA の結合を阻害し、収量を低下させます。

6. チューブを室温で 5 分間静置し、DNA をビーズに結合します。

7. チューブを磁気スタンド上で 15 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。

8. チューブを磁気スタンド上に置いたままで、上清を除去します。
磁性ビーズが見えづらい場合には、磁性ビーズと反対側にチップを差し入れて、上清を慎重に除去します。
9. チューブを磁気スタンドから下ろし、Wash WBB 1.6 mL (400 μ L の場合; サンプルの 4 倍容) を加えます。ピペティング 10 回により磁性ビーズを十分に再懸濁します。
10. チューブを磁気スタンド上で 2 分間または上清が透明になるまで静置し、溶液中のビーズを分離します。
11. チューブを磁気スタンド上に置いたままで、上清を除去します。
12. ステップ 9~11 の Wash WBB 洗浄を再度繰り返してください。
13. チューブを磁気スタンドから下ろし、Wash WBC 溶液 1 mL (400 μ L の場合; サンプルの 2.5 倍容) を加えます。ピペティング 10 回により磁性ビーズを十分に再懸濁します。
14. チューブを磁気スタンド上で 6 分間静置し、溶液中のビーズを分離します。
15. チューブを磁気スタンド上に置いたままで、上清を除去します。
16. ステップ 13~16 の Wash WBC 溶液洗浄を再度繰り返してください。
17. チューブを磁気スタンド上に置いたままで、チューブの底や壁についた水滴をピペットで吸い取るなどして、Wash WBC 溶液を可能な限り除去します (必要に応じて 5 分間風乾します)。全血サンプルの場合は溶出液 400 μ L、血清サンプルの場合は溶出液 40 μ L を入れます。
高濃度の DNA を得たい場合には、溶出液量を少なくすることが可能です。洗浄後の磁性ビーズを過度に乾燥すると、DNA が溶出しづらくなる場合があります。

18. チューブを磁気スタンドから下ろし、ピペティングにより磁性ビーズを十分に再懸濁し、室温で 2 分間静置します。完全に DNA を溶出するため、ピペティングにより磁性ビーズを再度懸濁します。

19. チューブを磁気スタンド上で 5 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。溶出 DNA を含む上清を、新しい保存用プレートまたはチューブに移します。

磁性ビーズが混入した場合には、元のチューブに溶液を戻し、ステップ 19 をやり直してください。

血清の場合には、溶出液 40 μ L のうち 2 μ L 以上を PCR に使用すると、良好な結果が得られます。



210217_QMJ_GenFindV2

ベックマン・コールター株式会社

本 社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 ☎ 0120-566-730 ☎ 03-6745-4704 ☎ 03-5530-2460
✉ bckkcas@beckman.com URL <http://www.beckmancoulter.co.jp>

