

# Agencourt ChloroPure

## 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リバーシブル固定化 (SPRI) 磁性ビーズ技術により、凍結乾燥葉の 6 mm パンチ 3 枚、粉末化した種 40 mg、生葉 40 mg からの DNA/RNA 抽出に対応します。本プロトコルでは、植物体のホモジネーション・溶解から 96 ウェルプレートを用いた DNA/RNA および RNA のみの抽出方法を解説します。

### 保存方法

Lysis Buffer 室温保存

Bind Buffer 4°C保存

Wash Buffer 室温保存

### 本マニュアルの対応製品

A47949 ChloroPure 384 preps

## Material Supplied by the User

### 反応プレート

96 ウェル 1.2 mL ディープウェルブロック

例: Thermo Scientific product # AB1127

96 ウェル 2.2 mL ディープウェルブロック

例: World Wide Medical product # 99181000

上のプレート用のシール

例: Thermo Scientific product # AB-0558

### 磁気プレート

A32782 Agencourt SPRIPlate 96R Ring Super Magnet Plate

### 保存プレート

96 ウェル 300  $\mu$ L 丸底プレート

例: Costar product # 07-200-105

### 試薬

100%イソプロパノール

70%エタノール (ヌクレアーゼフリー水で用時調製)

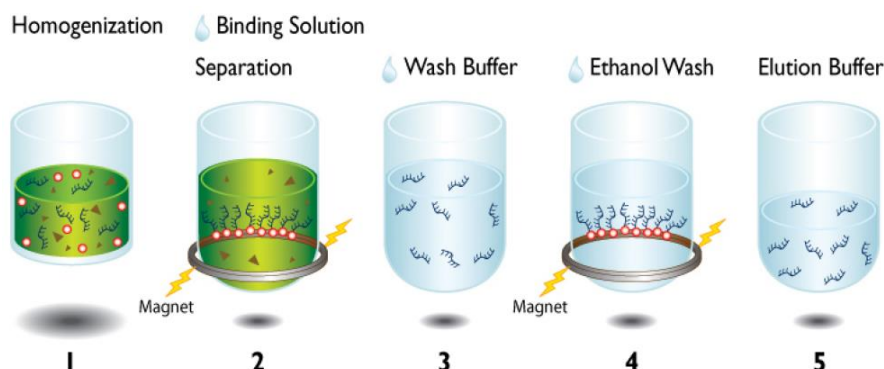
(RNA のみの抽出の場合) DNase I (RNase フリー; 2 U/ $\mu$ L)、DNase I Buffer

ヌクレアーゼフリー水

### RNase フリー条件での実験について

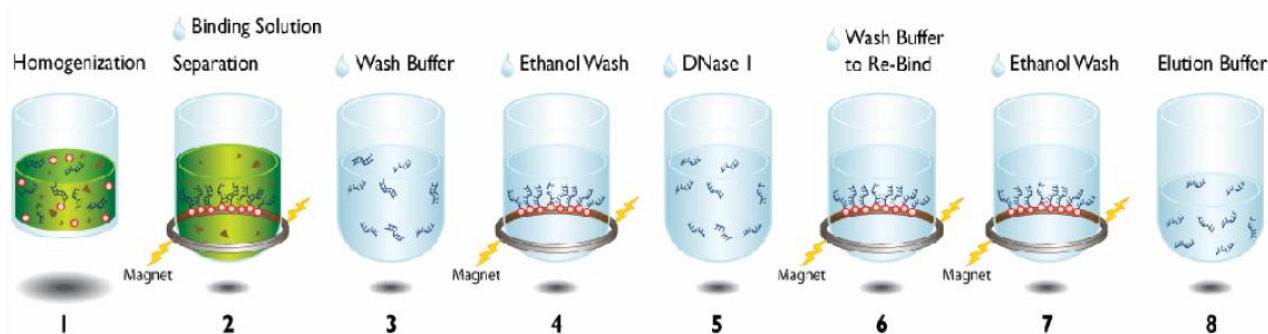
ChloroPure は RNase フリーにて製造されており、試薬製品にヌクレアーゼの混入がないことを確認しています。本試薬のご使用時は、サンプルへの RNase 混入を防ぐ対策を十分に取った上で、実験を行うことをお勧めします。

## Quick Reference (DNA/RNA 抽出の場合)



1. サンプルに Lysis Buffer 300  $\mu\text{L}$  を加えホモジナイズし、1,100  $\times g$  で 10 分間遠心分離。遠心上清 150  $\mu\text{L}$  を反応プレートに移す。
2. 反応プレートに Bind Buffer 溶液 150  $\mu\text{L}$  を加え、ピペッティング 5 回により混合し、室温で 5 分間静置。反応プレートを磁気プレート上で 2~4 分間静置し、上清を除去。
3. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、Wash Buffer 溶液 300  $\mu\text{L}$  を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁、1 分間静置。反応プレートを磁気プレート上で 2~4 分間静置し、上清を除去。
4. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、70%エタノール 300  $\mu\text{L}$  を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁。反応プレートを磁気プレート上で 2 分間静置し、上清を除去。70%エタノール洗浄を再度実施し、反応プレートを 5 分間風乾。
5. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、ヌクレアーゼフリー水 50  $\mu\text{L}$  を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁し、2 分間静置。反応プレートを磁気プレート上で 2 分間静置し、溶出核酸を含む上清 35  $\mu\text{L}$  を、新しい保存用プレートに移す。

## Quick Reference (RNA のみの抽出の場合)



1. サンプルに Lysis Buffer 300  $\mu$ L を加えホモジナイズし、1,100  $\times$ g で 10 分間遠心分離。遠心上清 150  $\mu$ L を反応プレートに移す。
2. 反応プレートに Bind Buffer 溶液 150  $\mu$ L を加え、ピペッティング 5 回により混合し、室温で 5 分間静置。反応プレートを磁気プレート上で 2~4 分間静置し、上清を除去。
3. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、Wash Buffer 溶液 300  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁、1 分間静置。反応プレートを磁気プレート上で 2~4 分間静置し、上清を除去。
4. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、70%エタノール 300  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁。反応プレートを磁気プレート上で 2 分間静置し、上清を除去。
5. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、DNase I 溶液 25  $\mu$ L を加え、ピペッティング 5 回により再懸濁。反応プレートをシールで封をして、37°C で 15 分間反応。
6. 反応プレートに Wash Buffer 溶液 138  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁し、室温で 5 分間静置。反応プレートを磁気プレート上で 2~4 分間静置し、上清を除去。
7. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、70%エタノール 300  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁。反応プレートを磁気プレート上で 2 分間静置し、上清を除去。70%エタノール洗浄を再度実施し、反応プレートを 5 分間風乾。
8. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、ヌクレアーゼフリー水 50  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁し、2 分間静置。反応プレートを磁気プレート上で 2 分間静置し、溶出核酸を含む上清 35  $\mu$ L を、新しい保存用プレートに移す。

## Purification Procedure

1. Wash Buffer 溶液を調製します。

Wash Buffer のボトルに、100%イソプロパノールを 80 ml 加え、混合します (Wash Buffer と 100%イソプロパノールを、3 : 2 の割合で混合)。調製後の溶液は、室温で保存します。

2. Bind Buffer 溶液を用時調製します。

1 サンプルあたり、Bind Buffer 6  $\mu$ L と 100%イソプロパノール 150  $\mu$ L を混合します。

3. (RNA のみの抽出の場合) DNase I 溶液を用時調製します。

1 サンプルあたり、1 $\times$  DNase 溶液 25  $\mu$ L が必要です。ヌクレアーゼフリー水 20  $\mu$ L、10 $\times$  DNase Buffer 2.5  $\mu$ L、DNase I 2.5  $\mu$ L を混合します。

4. サンプルに Lysis Buffer 溶液 300  $\mu$ L を加え、十分にホモジナイズします。サンプル量は、凍結乾燥葉の場合 6 mm パンチ 3 枚、種の場合 40 mg、生葉の場合 40 mg を超えないようにします。

凍結乾燥葉・生葉の場合には、直接 Lysis Buffer を加えて、ビーズ式ホモジナイザーでホモジナイズします。種の場合は、Lysis Buffer を加える前に予め粉末化しておきます。以降のステップをすぐに行わない場合、ホモジナイズしたサンプルは、-80 $^{\circ}$ Cで冷凍保存できます。

5. ホモジナイズしたサンプルを、1,100  $\times$ g で 10 分間遠心分離します。

6. 遠心上清 150  $\mu$ L を反応プレートに移します。

7. 反応プレートに、ステップ 2 で調製した Bind Buffer 溶液 150  $\mu$ L を加え、ピペッティング 5 回により穏やかに混合します。その後、室温で 5 分間静置します。

8. 反応プレートを磁気プレート上で 2~4 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。

9. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。

10. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、ステップ 1 で調製した Wash Buffer 溶液 300  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁します。その後、1 分間静置します。
11. 反応プレートを磁気プレート上で 2~4 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
12. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。  
DNA/RNA の両方の抽出を行う場合には、ステップ 22 に進んで下さい。  
RNA のみの抽出を行う場合には、そのままステップ 13 に進んで下さい。
13. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、70%エタノール 300  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁します。
14. 反応プレートを磁気プレート上で 2 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
15. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
16. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、ステップ 3 で調製した DNase I 溶液 25  $\mu$ L を加えます。
17. 磁性ビーズを、ピペッティング 5 回により再懸濁します。  
磁性ビーズから核酸が溶出します。
18. 反応プレートをシールで封をして、37°C で 15 分間反応します。
19. 反応プレートに Wash Buffer 溶液 138  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁し、室温で 5 分間静置します。  
Wash Buffer 溶液により、磁性ビーズに RNA が再結合します。
20. 反応プレートを磁気プレート上で 2~4 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。

21. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
22. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、70%エタノール 300  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁します。
23. 反応プレートを磁気プレート上で 2 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
24. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
25. ステップ 22~24 の 70%エタノール洗浄を再度繰り返してください。
26. 反応プレートを 5 分間風乾します。  
ウェルの壁に付いた水滴は乾燥させてください。磁性ビーズを過度に乾燥させると、収量が低下する場合があります。
27. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、ヌクレアーゼフリー水 50  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回により磁性ビーズを十分に再懸濁し、核酸を溶出します。  
溶出液量を変更することができますが、40  $\mu$ L 以上で溶出を行うようにして下さい。
28. 反応プレートを 2 分間静置します。
29. 反応プレートを磁気プレート上で 2 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。溶出核酸を含む上清 35  $\mu$ L を、新しい保存用プレートに移します。



12-QMJ-180713

## 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 🌐 <http://www.beckmancoulter.co.jp>

