

Agencourt FormaPure DNA

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、ホルマリン固定、パラフィン埋め込み (FFPE) 組織 10 µm 切片 3 枚までのキシレンフリーの DNA 抽出に対応します。本プロトコルでは、FFPE サンプルのパラフィン溶解、脱クロスリンク、組織溶解から、96 ウェルプレートおよびマイクロチューブを用いた DNA の抽出方法を解説します。

適用アプリケーション

次世代シーケンシング (アンプリコン解析、ターゲット・キャプチャー解析、エクソーム解析、全ゲノム解析)、通常のエンドポイント PCR、qPCR

保存方法

Mineral Oil	(MO)	室温保存
Lysis	(LBA)	室温保存
Bind	(BBA)	室温保存
Wash	(WBA)	室温保存
RNase A		室温保存
Proteinase K		室温保存

本マニュアルの対応製品

B89230 FormaPure DNA 50 preps

B89231 FormaPure DNA 96 preps

B89232 FormaPure DNA 384 preps

Material Supplied by the User

96 ウェル反応プレートを使用する場合

96 ウェル 1.2 mL ディープウェルブロック

例: Thermo Fisher, PN AB1127

96 ウェル 200 μ L 保存用プレート

上のプレート用のシール

1.5~1.7 mL マイクロチューブ

上のチューブ用のキャップロック

A32782 Agencourt SPRIPlate 96R Ring Super Magnet Plate

チューブを使用する場合

1.5~1.7 mL マイクロチューブ

上のチューブ用のキャップロック

A29182 Agencourt SPRIStand 6 Position Tube Magnet

試薬

80%エタノール (ヌクレアーゼフリー水で用時調製)

ヌクレアーゼフリー水

Quick Reference



1. FFPE 組織切片サンプルを 1.5 mL チューブに入れる。
2. チューブに Mineral Oil (MO) 450 μ L を加え、80°C で、5 分間反応。
ボルテックス 5 秒間 2 回で攪拌。
3. チューブに Lysis (LBA) 200 μ L を加え、10,000 $\times g$ 15 秒間で遠心分離。
水層に Proteinase K 20 μ L を加え、ピペッティング 10 回により混合。
55°C で少なくとも 60 分間、最大 16 時間、組織が完全に消化するまで反応。
4. チューブを 80°C で 60 分間反応し、反応後の水層を新しいプレートまたはチューブに移す。
5. 反応プレート・チューブに RNase A 5 μ L を加え、ピペッティング 5 回により混合。
室温で、5 分間反応。
6. 反応プレート・チューブに Bind (BBA) 300 μ L を加え、ピペッティング 10 回により混合。
室温で 5 分間静置後、磁気プレート・スタンド上で 10 分間静置。
磁気プレート・スタンド上に置いたままで、上清を除去。
7. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上から下ろす。
Wash (WBA) 400 μ L を加え、ピペッティングで磁性ビーズが完全に再懸濁するまで混合。
磁気プレート・スタンド上で 10 分間静置し、上清を除去。
8. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上から下ろす。
80%エタノール 750 μ L を加え、ピペッティングで磁性ビーズが完全に再懸濁するまで混合。
磁気プレート・スタンド上で 3 分間静置し、上清を除去、さらに 10 分間風乾。
9. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上から下ろす。
ヌクレアーゼフリー水 40 μ L 以上を加え、ピペッティングで磁性ビーズが完全に再懸濁するまで混合。
反応プレート・チューブに封をして、55°C で 1 分間静置。
磁気プレート・スタンド上で 1 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離。

溶出 DNA を含む上清を、新しい保存用プレート・チューブに移す。



Purification Procedure

1. サンプル調製

FFPE 組織切片サンプル (10 μm 切片 1~3 枚) を 1.5 mL チューブに入れます。

2. 脱パラフィン

- a. チューブに Mineral Oil (MO) 450 μL を加え、サンプルを液中に沈めます。
- b. 80°C で、5 分間反応します。
- c. ボルテックス 5 秒間 2 回で攪拌し、パラフィンを溶かし、サンプルを分散します。

3. 組織消化

- a. チューブに Lysis (LBA) 200 μL を加えます。ボルテックスはしないで下さい。
- b. 10,000 $\times g$ 15 秒間で遠心分離し、油層 (上層) と水層 (下層) に分離します。
油層が濁った場合には 80°C で 3 分間以上追加反応し、その後少なくとも 2 分間は室温で冷却してください。
- c. 水層に Proteinase K 20 μL を加え、ピペッティング 10 回により混合します。
このときに、油層を乱さないようにします。
- d. 55°C で少なくとも 60 分間、最大で 16 時間反応し、組織を完全に消化します。

4. 脱クロスリンク

- a. チューブを 80°C で、60 分間反応します。
- b. チューブを加熱器から下ろします。
- c. 水層を、可能な限り新しい反応プレートまたはチューブに移します。
このときに油層を乱さないようにし、以降の反応系に持ち込まないようにします。
微量の油層の持ち込みは、下流のアプリケーションに大きな影響を及ぼしません。

5. RNase A 処理

- a. 反応プレート・チューブに RNase A 5 μL を加えます。
- b. ピペッティング (P200 ピペットを 150 μL に設定) 5 回により混合します。
- c. 室温で、5 分間反応します。

6. DNA 結合

- a. Bind (BBA) のボトルを十分に攪拌し、磁性ビーズを完全に再懸濁します。
- b. 反応プレート・チューブに Bind (BBA) 300 μL を加え、ピペッティング (P1000 ピペットを 350 μL に設定) 10 回により、泡立てないように優しく混合します。

- c. 室温で、5 分間静置します。
- d. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 10 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- e. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上に置いたままで、上清を除去します。

7. 洗浄

- a. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上から下ろします。
- b. Wash (WBA) 400 μ L を加えます。
- c. ピペッティング (P1000 ピペットを 250 μ L に設定) 15 回または磁性ビーズが完全に再懸濁するまで、泡立てないように優しく混合します。
- d. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 10 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- e. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上に置いたままで、上清を除去します。

8. エタノール洗浄

- a. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上から下ろします。
- b. 用時調製した 80%エタノール 750 μ L を加えます。
- c. ピペッティング (P1000 ピペットを 600 μ L に設定) 20 回または磁性ビーズが完全に再懸濁するまで混合します。
- d. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 3 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- e. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上に置いたままで、上清を可能な限り除去します。
- f. マグネット上で 10 分間風乾します。

9. 溶出

- a. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上から下ろします。
- b. ヌクレアーゼフリー水 40 μ L 以上を加え、ピペッティング (P200 ピペットを 30 μ L に設定) 10 回または磁性ビーズが完全に再懸濁するまで混合します。
- c. 反応プレートはシールを、反応チューブはキャップをして、55°Cで 1 分間静置します。
- d. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 1 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- e. 溶出 DNA を含む上清を、新しい保存用プレート・チューブに移します。

f. 精製 DNA は、-20℃で保存します。



190702_QMJ_FormaPureDNA

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>

