

# Agencourt FormaPure XL 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 7 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	(LBD)	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

C35996 FormaPure XL DNA 50 preps

C35997 FormaPure XL DNA 96 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 (LBD) 200  $\mu$ L を加え、10,000  $\times g$  15 秒間で遠心分離。  
80°C で 5 分間反応し、2 分間は室温で冷却。  
水層に Proteinase K 30  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu\text{m}$  切片 1~7 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  $\mu\text{L}$  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 (LBD) 200  $\mu\text{L}$  を加えます。
- 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。
- c. 80°C で 5 分間反応します。
- d. 室温で 2 分間冷却します。
- e. 水層に Proteinase K 30  $\mu\text{L}$  を加え、ピペティング 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。
- f. 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  $\mu\text{L}$  を加えます。
- b. ピペティング (P200 ピペットを 150  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  を加え、ピペティング (P1000 ピペットを 350  $\mu\text{L}$  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  $\mu$ L を加えます。
- c. ピペッティング (P1000 ピペットを 250  $\mu$ 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  $\mu$ L を加えます。
- c. ピペッティング (P1000 ピペットを 600  $\mu$ 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  $\mu$ L 以上を加え、ピペッティング (P200 ピペットを 30  $\mu$ 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\_FormaPureXLDNA

## 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>

