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 Solid Phase Reversible Immobilization (SPRI) 磁性ビーズ技術により、Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (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、エキソーム解析、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

1.2 mL 96 ウェルプレート

例：Thermo Fisher Scientific, AB1127

200 µL 96 ウェル保存用プレート

プレート用のシール

1.5~1.7 mL マイクロチューブ

チューブ用のキャップロック

96 ウェル用マグネットプレート

例：Beckman Coulter SPRIPlate 96R Ring Super Magnet Plate, A32782

例：ALPAQUA Magnum FLX™ Enhanced Universal Magnet Plate, A000400

チューブを使用する場合

1.5~1.7 mL マイクロチューブ

チューブ用のキャップロック

マイクロチューブ用マグネットスタンド

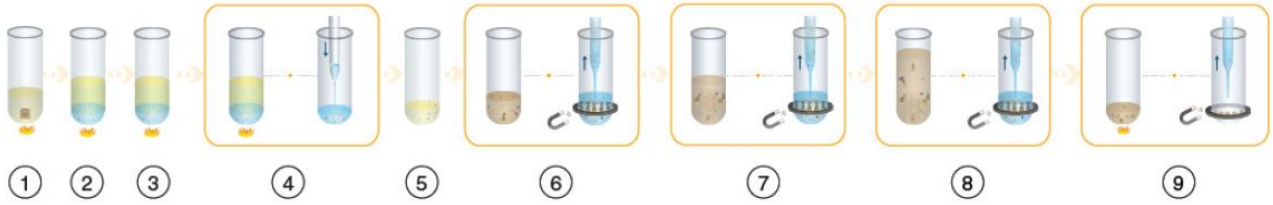
例：Beckman Coulter SPRIStand 6 Position Tube Magnet, A29182

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 450 µL を加え、80℃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 µL を加え、10,000 ×*g* 15 秒間で遠心分離。
   80℃で 5 分間反応し、2 分間は室温で冷却。
   水層に Proteinase K 30 µL を加え、ピペッティング 10 回により混合。
   55℃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℃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 µL 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 µL 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 µL 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 µL 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 µL 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℃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 1~7 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 450 µL を加え、サンプルを液中に沈めます。

   b. 80℃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 µL を加えます。

   b. 10,000 ×*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℃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 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。

   f. 55℃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℃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 のボトルを十分に撹拌し、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 µL を加えます。

c. ピペッティング (P1000 ピペットを 250 µL 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 µL を加えます。

c. ピペッティング (P1000 ピペットを 600 µL 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 µL 以上を加え、ピペッティング (P200 ピペットを 30 µL 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℃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。

230714_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　FAX 03-5530-2460
e-mail bckkcas@beckman.com　URL http://www.beckmancoulter.co.jp