FormaPure XL Total
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 と RNA 両方の抽出に対応します。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 と RNA 両方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 (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、RNA-Seq 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
Re-Bind RBA		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

C35991 FormaPure XL Total 50 preps

C35992 FormaPure XL Total 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 mL マイクロチューブ

チューブ用のキャップロック

V&P Scientific 7 Bar Magnet, VP 771MWZM-1ALT

チューブを使用する場合

1.5 mL マイクロチューブ

チューブ用のキャップロック

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)

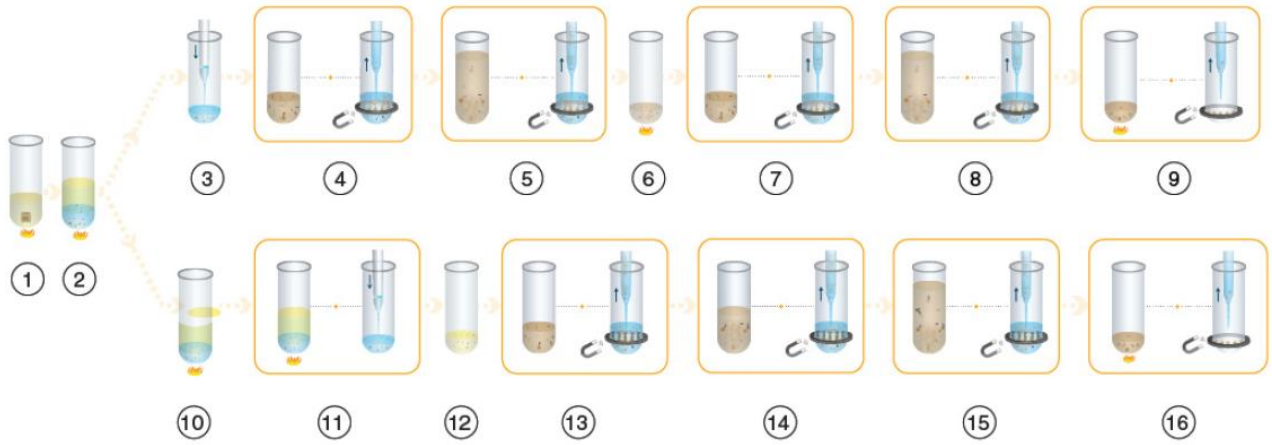
DNase I (RNase フリー)、DNase I Buffer

ヌクレアーゼフリー水

RNase フリー条件での実験について

FormaPure RNA 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。

Process Overview



1. 80℃で脱パラフィン
2. 60℃で組織溶解／脱クロスリンク
3. RNA 抽出用サンプルの取り出し
4. 核酸の磁性ビーズへの結合
5. 80%エタノール洗浄
6. DNase I 処理
7. RNA の磁性ビーズへの再結合
8. 80%エタノール洗浄
9. 精製 RNA の溶出
10. 80℃で追加の脱クロスリンク
11. DNA 抽出用サンプルの取り出し
12. RNase A 処理
13. DNA の磁性ビーズへの結合
14. Wash での洗浄
15. 80%エタノール洗浄
16. 精製 DNA の溶出

Purification Procedure

Sample Preparation

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／脱クロスリンク

   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. 60℃で、2 時間反応します。

Lysate Splitting

1. 10,000 ×*g* 5 分間で遠心分離します。

2. 水層の上清 (沈殿を除く) 100 μL を反応プレートまたはチューブに移します。

   <u>これが、RNA 抽出用のサンプルになります。</u>

   このときに油層と沈殿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。

   ピペットチップが詰まってしまう場合には追加で遠心分離をしてください。

   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。

3. 油層と水層がある元のチューブを、60℃で、1 時間反応します。

   <u>これが、DNA 抽出用のサンプルになります。</u>

   RNA 抽出中に、この 60℃の反応を行うことができ、反応時間はオーバーナイトまで延長することも可能です。

RNA Isolation

1. 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 150 µL を加え、ピペッティング (P200 ピペットを 150 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。
2. 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. 80%エタノール 375 µL を加えます。
   c. ピペッティング (P1000 ピペットを 300 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、上清を除去します。
   f. マグネット上で 10 分間風乾します。
3. DNase I 処理
   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 80 µL、10× DNase I Buffer 10µL、DNase I 10 µL を 5 回混合し、DNase I 溶液 100 µL を調製します。
   c. DNase I 溶液 100 µL を磁性ビーズに加えます。
   d. ピペッティング (P200 ピペットを 80 µL に設定) 5 回により、泡立てないように優しく混合します。
   e. 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、37℃で 20 分間反応します。
4. 再結合
   a. 反応プレート・チューブに Re-Bind RBA 150 µL を加え、ピペッティング (P200 ピペットを 150 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。
   b. 室温で、5 分間静置します。

c. 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。

d. 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。

5. 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. 80%エタノール 375 µL を加えます。

c. ピペッティング (P1000 ピペットを 300 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、上清を除去します。

f. マグネット上で 10 分間風乾します。

6. 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 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、60℃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 RNA 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 RNA は-20℃、長期保存する場合は-80℃で保存します。

DNA Isolation

1. 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。

2. RNase A 処理

a. 反応プレート・チューブに RNase A 2.5 µL を加えます。

b. ピペッティング (P200 ピペットを 75 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。

3. 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 150 µL を加え、ピペッティング (P200 ピペットを 150 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。

4. 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 200 µL を加えます。

c. ピペッティング (P200 ピペットを 125 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。

5. 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 375 µL を加えます。

c. ピペッティング (P1000 ピペットを 300 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。

6. 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 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、60℃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。

210217_QMJ_FormaPureXLTotal

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