

# Agencourt GenFind V2

## 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、血液 (凍結/非凍結の、抗凝固剤入り全血/血清) からの DNA 抽出に対応します。本プロトコルでは全血/血清 200  $\mu$ L をサンプルとして 96 ウェルプレートを用いた抽出方法、および全血/血清 400  $\mu$ L をサンプルとして 2 mL チューブを用いた抽出方法を解説します。

## 適用アプリケーション

アガロースゲル解析、PCR、制限酵素処理、メンブレン上でのハイブリダイゼーション解析 (サブロット・ドットロットなど)、AFLP・RFLP・RAPD・マイクロサテライト・SNP を用いたジェノタイプング/フィンガープリンティング解析

## 保存方法

Lysis LBC	(Lysis Buffer)	室温保存
Proteinase K		-20°C 保存
Proteinase K Buffer	(PK Buffer)	室温保存
Bind BBB	(Binding Buffer)	4°C 保存
Wash BBB	(Wash 1)	室温保存
Wash BBC	(Wash 2)	室温保存

## 本マニュアルの対応製品

A41499 GenFind V2 50 preps

A41497 GenFind V2 384 preps

## Material Supplied by the User

### 96 ウェル反応プレートの場合

96 ウェル 1.2 mL ディープウェルプレート

例: Thermo Fisher product # AB1127

上のプレート用のシール

例: Thermo Fisher product # AB-0558

A32782 Agencourt SPRIPlate 96R Ring Super Magnet Plate

### 2 mL チューブの場合

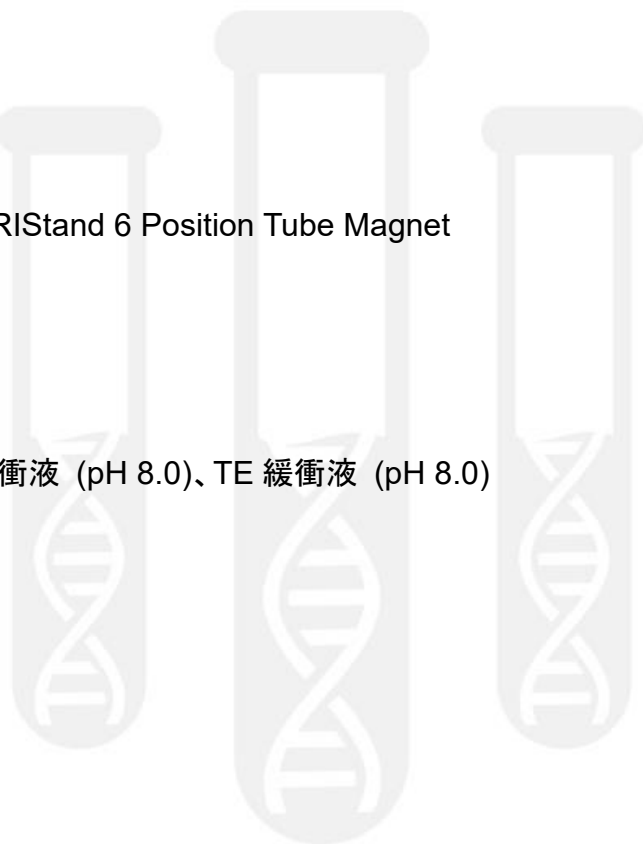
2 mL マイクロチューブ

A29182 Agencourt SPRISand 6 Position Tube Magnet

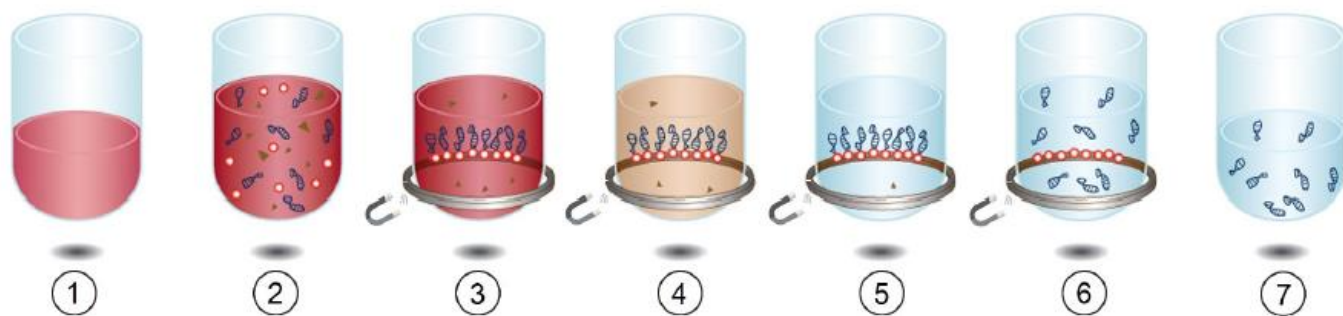
### 試薬

100%エタノール

溶出液: 滅菌水、Tris 緩衝液 (pH 8.0)、TE 緩衝液 (pH 8.0)



**Quick Reference** (全血/血清 200  $\mu$ L、96 ウェル反応プレートの場合)



1. 全血・血清サンプル 200  $\mu$ L、Lysis LBC 400  $\mu$ L、Proteinase K 溶液 9  $\mu$ L をピペッティング 10 回により混合し、37°Cで 10 分間、または室温で 30 分間反応。
2. Bind BBB 300  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回により混合し、室温で 5 分間静置。
3. 磁気プレート上で 15 分間静置後、上清を除去。
4. 磁気プレートから下ろし、Wash WBB 800  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回で再懸濁。磁気プレート上で 10 分間静置し、上清を除去。この Wash WBB 洗浄を再度繰り返す。
5. 磁気プレートから下ろし、Wash WBC 溶液 500  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回で再懸濁。磁気プレート上で 6 分間静置し、上清を除去。この Wash WBC 溶液洗浄を再度繰り返す。
6. 磁気プレート上で、全血サンプルの場合は溶出液 200  $\mu$ L、血清サンプルの場合は溶出液 40  $\mu$ L を添加。磁気プレートから下ろし、ピペッティングで十分に再懸濁し、室温で 2 分間静置により DNA を溶出。磁気プレート上で 10 分間静置。
7. 溶出 DNA を保存用プレートに移す。全血サンプルの場合は、溶出液のうち 25  $\mu$ L を元のプレートに残す。

## Purification Procedure

### 全血/血清 200 $\mu$ L 以下、96 ウェル反応プレートでの実験手順

凍結または非凍結の、凝固剤入り全血または血清の血液サンプルに対応します。凍結サンプルは、室温または 37°C で解凍し、十分に転倒混和します。

1. 96  $\mu$ g/ $\mu$ L Proteinase K 溶液と Wash WBC (Wash 2) 溶液を調製します。

Proteinase K のボトルに、Proteinase K Buffer (PK Buffer) を 50 preps、384 preps いずれの場合も 1 mL 加え、混合します。調製後の溶液は、-20°C で保存します。

Wash WBC (Wash 2) のボトルに、100%エタノールを 50 preps の場合は 105 mL、384 preps の場合は 375 mL 加え、混合します (Wash WBC (Wash 2) と 100%エタノールを、1 : 3 の割合で混合)。調製後の溶液は、室温で保存します。

2. 血液サンプルを数回転倒混和します。ピペッティングやボルテックスで攪拌は推奨しません。200  $\mu$ L 以下の血液サンプルを 1.2 mL ウェルサイズの 96 ウェル反応プレートに入れます。

3. Lysis LBC (Lysis Buffer) 400  $\mu$ L (200  $\mu$ L の場合; サンプルの 2 倍容) と Proteinase K (96  $\mu$ g/ $\mu$ L) 溶液 9  $\mu$ L (200  $\mu$ L の場合; サンプルの 0.045 倍容) とを加え、ピペッティング 10 回により泡立てないように混合します。

4. 反応プレートに封をして、37°C で 10 分間、または室温で 30 分間反応します。

5. Bind BBB (Binding Buffer) のボトルを 20 回以上攪拌し、ビーズを完全に再懸濁します。

Bind BBB (Binding Buffer) 300  $\mu$ L (200  $\mu$ L の場合; サンプルの 1.5 倍容) を加え、ピペッティング 10 回により混合します。

磁性ビーズと DNA を結合するステップです。ピペッティングは泡立たないようにゆっくりと行ってください。気泡は磁性ビーズと DNA の結合を阻害し、収量を低下させます。

6. 反応プレートを室温で 5 分間静置し、DNA をビーズに結合します。

7. 反応プレートを磁気プレート上で 15 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
8. 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。  
磁性ビーズが見えづらい場合には、ウェル底の中心部にチップを差し入れて、リング状の磁性ビーズを乱さないように上清を除去します
9. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、Wash WBB (Wash 1 800  $\mu$ L) (200  $\mu$ L の場合; サンプルの 4 倍容) を加えます。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ます。
10. 反応プレートを磁気プレート上で 10 分間または上清が透明になるまで静置し、溶液中のビーズを分離します。
11. 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。
12. ステップ 9~11 の Wash WBB (Wash 1) 洗浄を再度繰り返してください。
13. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、Wash WBC (Wash 2) 溶液 500  $\mu$ L (200  $\mu$ L の場合; サンプルの 2.5 倍容) を加えます。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ます。
14. 反応プレートを磁気プレート上で 6 分間静置し、溶液中の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. ステップ 13~15 の Wash WBC (Wash 2) 溶液洗浄を再度繰り返してください。
17. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、プレートの底や壁についた水滴をピペットで吸い取るなどして、Wash WBC (Wash 2) 溶液を可能な限り除去します (必要に応じて 5 分間風乾します)。全血サンプルの場合は溶出液 200  $\mu$ L、血清サンプルの場合は溶出液 40  $\mu$ L を入れます。

高濃度の DNA を得たい場合には、溶出液量を少なくすることが可能です。洗浄後の磁性ビーズを過度に乾燥すると、DNA が溶出しづらくなる場合があります。

**18.** 反応プレートが磁気プレートから下ろし、ピペッティングにより磁性ビーズを十分に再懸濁し、室温で 2 分間静置します。完全に DNA を溶出するため、ピペッティングにより磁性ビーズを再度懸濁します。

**19.** 反応プレートを磁気プレート上で 10 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。溶出 DNA を含む上清を、新しい保存用プレートまたはチューブに移します。

全血サンプルの場合は、溶出液 25  $\mu\text{L}$  を元の反応プレートに残すようにします。血清サンプルの場合は、溶出液を元の反応プレートに残す必要はありません。磁性ビーズが混入した場合には、元の反応プレートに溶液を戻し、ステップ 19 をやり直してください。

血清サンプルの場合には、溶出液 40  $\mu\text{L}$  のうち 2  $\mu\text{L}$  以上を PCR に使用すると、良好な結果が得られます。

### 全血/血清 400 $\mu$ L 以下、2 mL チューブでの実験手順

凍結または非凍結の、凝固剤入り全血または血清の血液サンプルに対応します。凍結サンプルは、室温または 37°C で解凍し、十分に転倒混和します。

全血/血清 400  $\mu$ L をサンプルとする場合には、2 mL チューブを使用してください。1.7 mL チューブを使用する場合には、サンプル量を 300  $\mu$ L にしてください。

1. 96  $\mu$ g/ $\mu$ L Proteinase K 溶液と Wash WBC (Wash 2) を調製します。

Proteinase K のボトルに、Proteinase K Buffer (PK Buffer) を 50 preps、384 preps いずれの場合も 1 mL 加え、混合します。調製後の溶液は、-20°C で保存します。

Wash WBC (Wash 2) のボトルに、100% エタノールを 50 preps の場合は 105 mL、384 preps の場合は 375 mL 加え、混合します (Wash WBC (Wash 2) と 100% エタノールを、1 : 3 の割合で混合)。調製後の溶液は、室温で保存します。

2. 血液サンプルを数回転倒混和します。ピペッティングやボルテックスで攪拌は推奨しません。400  $\mu$ L 以下の血液サンプルを 2 mL マイクロチューブに入れます。

3. Lysis LBC (Lysis Buffer 800  $\mu$ L) (400  $\mu$ L の場合; サンプルの 2 倍容) と Proteinase K (96  $\mu$ g/ $\mu$ L) 溶液 18  $\mu$ L (400  $\mu$ L の場合; サンプルの 0.045 倍容) とを加え、ピペッティング 10 回により泡立てないように混合します。

4. チューブのキャップを閉め、37°C で 10 分間、または室温で 30 分間反応します。

5. Bind BBB (Binding Buffer) のボトルを 20 回以上攪拌し、ビーズを完全に再懸濁します。

Bind BBB (Binding Buffer) 600  $\mu$ L (400  $\mu$ L の場合; サンプルの 1.5 倍容) を加え、ピペッティング 10 回により混合します。

磁性ビーズと DNA を結合するステップです。ピペッティングは泡立たないようにゆっくりと行ってください。気泡は磁性ビーズと DNA の結合を阻害し、収量を低下させます。

6. チューブを室温で 5 分間静置し、DNA をビーズに結合します。

7. チューブを磁気スタンド上で 15 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
8. チューブを磁気スタンド上に置いたままで、上清を除去します。  
磁性ビーズが見えづらい場合には、磁性ビーズと反対側にチップを差し入れて、上清を慎重に除去します。
9. チューブを磁気スタンドから下ろし、Wash WBB (Wash 1) 1.6 mL (400  $\mu$ L の場合; サンプルの 4 倍容) を加えます。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ます。
10. チューブを磁気スタンド上で 2 分間または上清が透明になるまで静置し、溶液中のビーズを分離します。
11. チューブを磁気スタンド上に置いたままで、上清を除去します。
12. ステップ 9~11 の Wash WBB (Wash 1) 洗浄を再度繰り返してください。
13. チューブを磁気スタンドから下ろし、Wash WBC (Wash 2) 溶液 1 mL (400  $\mu$ L の場合; サンプルの 2.5 倍容) を加えます。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ます。
14. チューブを磁気スタンド上で 6 分間静置し、溶液中のビーズを分離します。
15. チューブを磁気スタンド上に置いたままで、上清を除去します。
16. ステップ 13~16 の Wash WBC (Wash 2) 溶液洗浄を再度繰り返してください。
17. チューブを磁気スタンド上に置いたままで、チューブの底や壁についた水滴をピペットで吸い取るなどして、Wash WBC (Wash 2) 溶液を可能な限り除去します (必要に応じて 5 分間風乾します)。全血サンプルの場合は溶出液 400  $\mu$ L、血清サンプルの場合は溶出液 40  $\mu$ L を入れます。  
高濃度の DNA を得たい場合には、溶出液量を少なくすることが可能です。洗浄後の磁性ビー



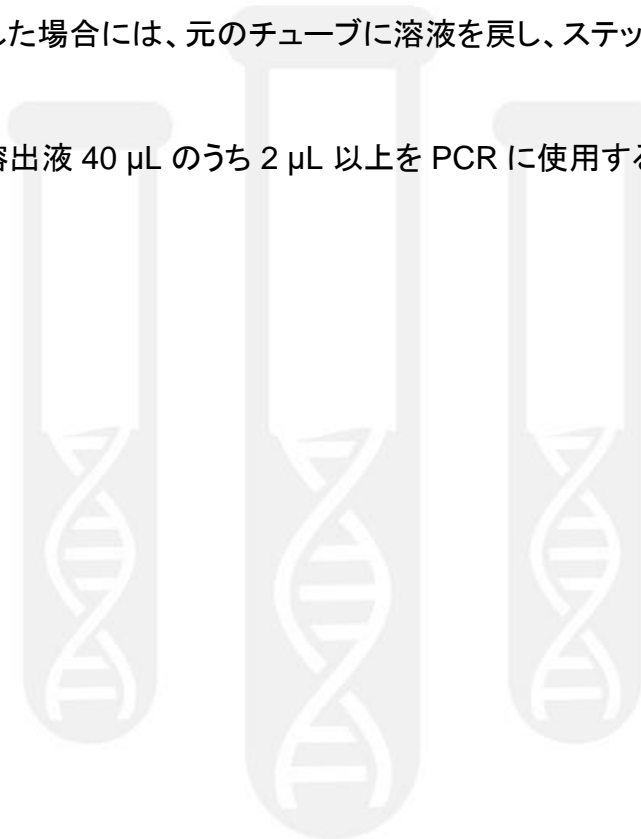
ズを過度に乾燥すると、DNA が溶出しづらくなる場合があります。

18. チューブを磁気スタンドから下ろし、ピペティングにより磁性ビーズを十分に再懸濁し、室温で 2 分間静置します。完全に DNA を溶出するため、ピペティングにより磁性ビーズを再度懸濁します。

19. チューブを磁気スタンド上で 5 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。溶出 DNA を含む上清を、新しい保存用プレートまたはチューブに移します。

磁性ビーズが混入した場合には、元のチューブに溶液を戻し、ステップ 19 をやり直してください。

血清の場合には、溶出液 40  $\mu$ L のうち 2  $\mu$ L 以上を PCR に使用すると、良好な結果が得られます。



180805\_QMJ\_GenFindV2

## 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>

