GenFind V3
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、血液 (凍結/非凍結の、クエン酸/EDTA/ヘパリンなど抗凝固剤入り全血/血清) および培養細胞からの DNA 抽出に対応します。本プロトコルでは 50~400 µL のサンプル容量について、96 ウェルプレートとマイクロチューブを用いた抽出方法を解説します。

保存方法

Lysis LBB	室温保存	
Bind BBB	4℃ 保存	
Wash WBB	室温保存	白い沈殿が生じた場合は、軽く振って再溶解してください。
Wash WBC	室温保存	
Proteinase K	室温保存	

本マニュアルの対応製品

C34880 GenFind V3	50 preps for 200 µL Sample, 25 preps for 400 µL Sample
C34881 GenFind V3	384 preps for 200 µL Sample, 192 preps for 400 µL Sample

Material Supplied by the User

96 ウェル反応プレートの場合

96 ウェル 2 mL ディープウェルプレート

例：Beckman Coulter Sterile SQ Well Plate, 609681

96 ウェル用マグネットプレート

例：V&P Bar Magnetic Separation Plate, VP-771MWZM-1-ALT

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

マイクロチューブの場合

2 mL マイクロチューブ

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

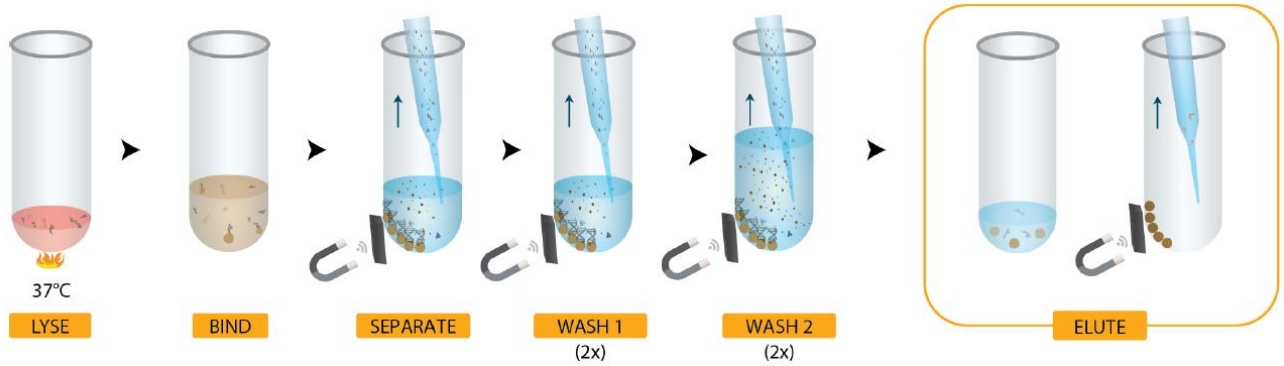
試薬

100%エタノール

PBS (サンプルが少容量の場合に必要)

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

Quick Reference (全血・血清サンプル 200 µL の場合)



1. 全血・血清サンプル 200 µL、Lysis LBB 500 µL、Proteinase K 30 µL をピペッティング 10 回により混合し、37℃で 10 分間、または室温で 30 分間反応。
2. Binding BBB 300 µL 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・スタンド上で 15 分間静置後、上清を除去。
4. 磁気プレート・スタンドから下ろし、Wash WBB 800 µL を加え、ピペッティング 10 回で再懸濁。磁気プレート・スタンド上で 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・スタンドから下ろし、Wash WBC 溶液 1600 µL を加え、ピペッティング 10 回で再懸濁。磁気プレート・スタンド上で 8 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・スタンド上で、全血サンプルの場合は溶出液 200 µL、血清サンプルの場合は溶出液 40 µL を添加。磁気プレート・スタンドから下ろし、ピペッティングで十分に再懸濁し、室温で 2 分間静置後、再度ピペッティングでの十分に再懸濁により DNA を溶出。磁気プレート・スタンド上で 2 分間静置。
7. 溶出 DNA を保存用プレート・チューブに移す。

Purification Procedure

サンプル調製

1. Wash WBC 溶液を調製します。
   Wash WBC のボトルに 100%エタノールを、Wash WBC : 100%エタノール = 1 : 3 の割合で加え、混合します。調製後の溶液は、室温で保存します。
2. 本製品は、血液 (凍結/非凍結の、クエン酸/EDTA/ヘパリンなど抗凝固剤入り全血/血清) および培養細胞からの DNA 抽出に対応します
   a. 凍結サンプルの場合は、室温または 37℃で融解します。
   b. 血液サンプルの場合は、数回転倒混和します。ピペッティングやボルテックスで撹拌は推奨しません。
   c. 培養細胞サンプル (200 万細胞以下) の場合は、PBS 200 µL で再懸濁します。
   d. サンプル容量 200 µL の場合は、96 ウェル 2 mL ディープウェルプレートで抽出を行うことができます。
3. サンプル容量が 200 µL 以下の場合は、PBS を加えて 200 µL にメスアップして下さい。

全血/血清 400 µL 以下の実験手順

1. Lysis LBB を、サンプル容量の 2 倍容＋100 µL 加えます。
   サンプル容量 200 µL の場合は、500 µL、サンプル容量 400 µL の場合は、900 µL。
2. Proteinase K を、サンプル容量の 0.15 倍容加えます。
   a. サンプル容量 200 µL の場合は、30 µL、サンプル容量 400 µL の場合は、60 µL。
   b. ピペッティング 10 回により優しく混合します。
   c. サンプルを泡立てないように優しく混合します。泡立てると、収量や精製度を低下させる可能性があります。
3. 37℃で 10 分間反応します。
   a. 反応プレート・チューブをシールすることをお勧めします。サンプル容量が 200 µL を超える場合には、反応時間を 5 分間延ばして下さい。
   b. 室温で反応する場合は、30 分間として下さい。
4. Bind BBB を、サンプル容量の 1.5 倍容加えます。
   a. サンプル容量 200 µL の場合は、300 µL、サンプル容量 400 µL の場合は、600 µL。

b. ピペッティング 10 回により優しく混合します。

5. 室温で 5 分間静置します。

6. 反応プレート・チューブを磁気プレート・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。

a. サンプルの色が濃いため、磁性ビーズの磁石への結合を目視確認することは難しいですが、所定時間経過後は次のステップに進んでください。

b. サンプル容量が 200 µL を超える場合には、静置時間を 5 分間延ばして下さい。

7. 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。
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。

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します。

a. Wash WBB を、サンプル容量の 4 倍容加えます。
サンプル容量 200 µL の場合は、800 µL、サンプル容量 400 µL の場合は、1600 µL。

b. ピペッティング (P1000 ピペットを 700 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優しく混合します。
サンプル容量 400 µL の場合は、先に 800 µL を加えて再懸濁してから、残りの 800 µL を加えると再懸濁が容易になります。

9. 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。

a. 上清は残留した血液成分により、褐色がかっている可能性があります。

b. サンプル容量が 200 µL を超える場合には、静置時間を 5 分間延ばして下さい。

10. 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。

11. 8.~10.のステップを繰り返し行い、合計 2 回の Wash WBB 洗浄を行います。
2 回目の洗浄では、1 回目のほど磁性ビーズは凝集しません。 この洗浄では消化したタンパク質を除去するため、十分に再懸濁することが重要です。再懸濁が不十分な場合には、最終溶出で磁性ビーズが凝集し、DNA 溶出に悪影響が出る可能性があります。

12. 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、Wash WBC 溶液 (サンプル調製ステップ 1 で調製) を、1600 µL 加えます。
ピペッティング (P1000 ピペットを 800 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優しく混合します。

先に 800 µL を加えて再懸濁してから、残りの 800 µL を加えると再懸濁が容易になります。

13. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 8 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。

14. 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。

15. 12.~14.のステップを繰り返し行い、合計 2 回の Wash WBC 溶液洗浄を行います。
できるだけ Wash WBC 溶液を取り除くようにします。磁性ビーズが湿っている場合は、室温にて 5 分間以内で乾燥させてください。過剰な磁性ビーズの乾燥は、DNA 溶出効率を低下させる可能性があります。

16. 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、溶出液を加えます。

a. 全血サンプルの場合は、サンプル容量と等量の溶出液を加えます。
サンプル容量 200 µL の場合は、200 µL、サンプル容量 400 µL の場合は、400 µL。

b. 血清サンプルの場合は、40 µL の溶出液を加えます。
溶出液量を少なくすると、DNA 収量が低下する可能性があります。

17. 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、ピペッティングにより磁性ビーズが完全に再懸濁するまで優しく混合します。
常温で 2 分間静置し、再度ピペッティングにより磁性ビーズが完全に再懸濁するまで優しく混合します。

18. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 2 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。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、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。
磁性ビーズを吸ってしまった場合には、再度磁気プレート・スタンド上で 2 分間静置し、磁性ビーズと反対側にチップを差し入れて、上清をゆっくりと移します。

230714_QMJ_GenFindV3

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