

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・コールターのスリッドフェーズリバーシブル固定化 (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 μ L 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°C 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 μ L Sample, 25 preps for 400 μ L Sample
C34881 GenFind V3	384 preps for 200 μ L Sample, 192 preps for 400 μ L 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

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

マイクロチューブの場合

2 mL マイクロチューブ

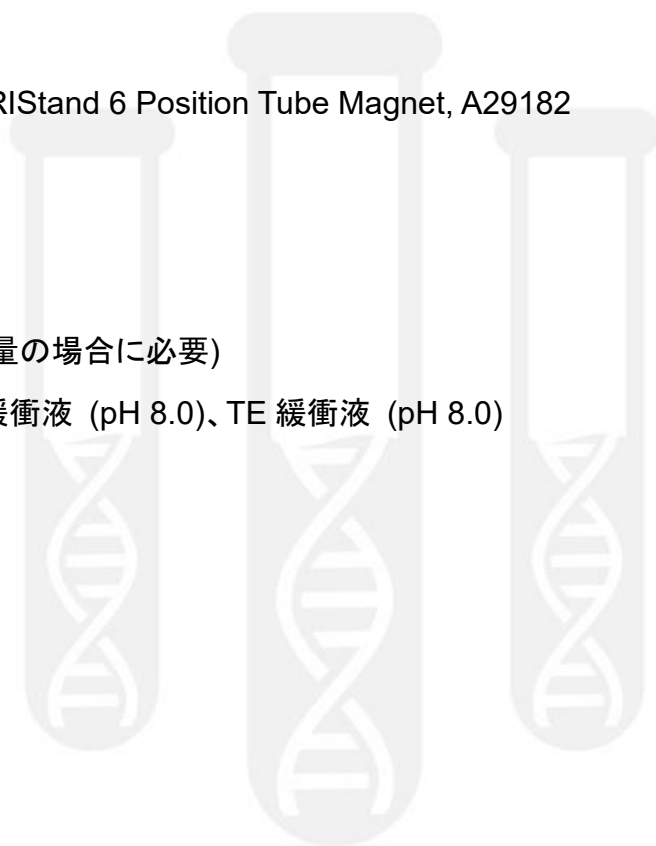
Beckman Coulter SPRIStand 6 Position Tube Magnet, A29182

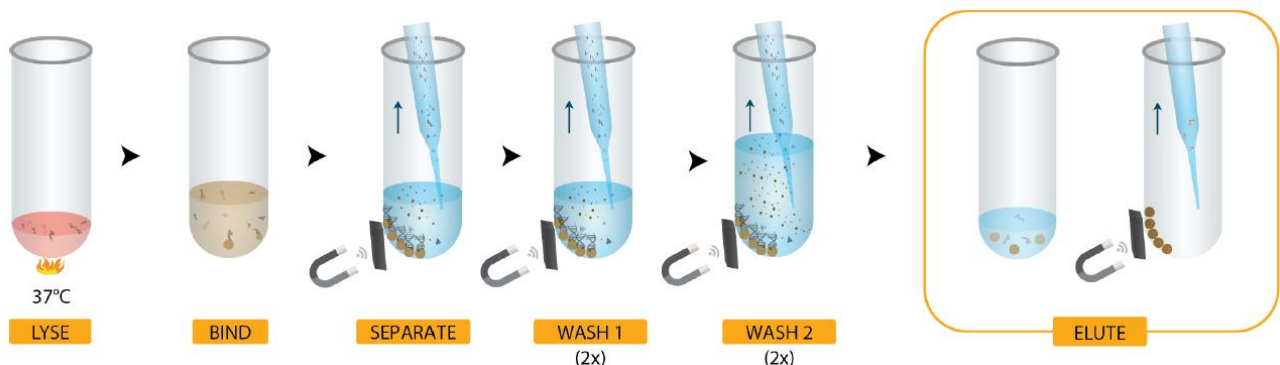
試薬

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 μ L の場合)

1. 全血・血清サンプル 200 μ L、Lysis LBB 500 μ L、Proteinase K 30 μ 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. Binding BBB 300 μ 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・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 μ L 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 μ L 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 μ L、血清サンプルの場合は溶出液 40 μ L 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°C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攪拌は推奨しません。

c. 培養細胞サンプル（200 万細胞以下）の場合は、PBS 200 μ L で再懸濁します。

d. サンプル容量 200 μ L 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 μ L 以下の場合は、PBS を加えて 200 μ L にメスアップして下さい。

全血/血清 400 μ L 以下の実験手順

1. Lysis LBB を、サンプル容量の 2 倍容+100 μ L 加えます。

サンプル容量 200 μ L の場合は、500 μ L、サンプル容量 400 μ L の場合は、900 μ L。

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 μ L の場合は、30 μ L、サンプル容量 400 μ L の場合は、60 μ L。

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°C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 μ L 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 μ L の場合は、300 μ L、サンプル容量 400 μ L の場合は、600 μ L。

- 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 μ L 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 μ L の場合は、800 μ L、サンプル容量 400 μ L の場合は、1600 μ L。
 - b. ピペッティング (P1000 ピペットを 700 μ 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優しく混合します。

サンプル容量 400 μ L の場合は、先に 800 μ L を加えて再懸濁してから、残りの 800 μ L 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 μ L 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 μ L 加えます。

ピペッティング (P1000 ピペットを 800 μ 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優しく混合します。

先に 800 μ L を加えて再懸濁してから、残りの 800 μ L 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 μ L の場合は、200 μ L、サンプル容量 400 μ L の場合は、400 μ L。

b. 血清サンプルの場合は、40 μ L 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。

210217_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 ☎ 03-5530-2460
✉ bckkcas@beckman.com URL <http://www.beckmancoulter.co.jp>