

Apostle MiniMax™ High Efficiency cfDNA Isolation Kit 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

Apostle MiniMax™ の磁性ナノ粒子技術により、セルフリーの血漿、血清、尿からの cfDNA (cell free DNA) 抽出に対応します。抽出した cfDNA は、PCR やシーケンスなどの幅広いアプリケーションで利用可能です。

保存方法

Magnetic Nanoparticles	室温暗所保存	使用前に十分に再懸濁してください。
Proteinase K	室温暗所保存	
Sample Lysis Buffer	室温暗所保存	沈殿があるときは、37°C以下で再溶解してください。
cfDNA Lysis/Binding Solution	室温暗所保存	沈殿があるときは、37°C以下で再溶解してください。
cfDNA Wash Solution	室温暗所保存	沈殿があるときは、37°C以下で再溶解してください。
cfDNA 2 nd Wash Solution	室温暗所保存	
cfDNA Elution Solution	室温暗所保存	

本マニュアルの対応製品

C40604 Apostle MiniMax™ High Efficiency cfDNA Isolation Kit	1 mL × 10 Preps
C40603 Apostle MiniMax™ High Efficiency cfDNA Isolation Kit	1 mL × 50 Preps
C40605 Apostle MiniMax™ High Efficiency cfDNA Isolation Kit	5 mL × 50 Preps

Material Supplied by the User

反応チューブと磁気スタンド

15 mL コニカルチューブ

15 mL コニカルチューブに対応するマグネットスタンド

1.5 mL マイクロチューブ

1.5 mL マイクロチューブに対応するマグネットスタンド

例: Beckman Coulter SPRISand 6 Position Tube Magnet, A29182

試薬

100%エタノール

機器類

ボルテックス

シェーカー

37°Cに対応するインキュベーター

1.5 mL チューブに対応する遠心機

Purification Procedure



A. サンプル溶解

1. 15 mL コニカルチューブに、下表の通りに Proteinase K と Sample Lysis Buffer を加えます。
サンプルを入れる前に、Proteinase K と Sample Lysis Buffer を混合しないでください。

Reagents	Plasma/serum volume		
	1 mL	2 mL	5 mL
Proteinase K	40 uL	80 uL	200 uL
Plasma/serum	1 mL	2 mL	5 mL
Sample Lysis Buffer	100 uL	200 uL	500 uL

2. ボルテックスにより軽く混合し、60°Cで 20 分間反応します。
3. 反応後、室温に静置します。

B. cfDNA の磁性ナノ粒子への結合

4. 下表の通りに cfDNA Lysis/Binding Solution と Magnetic Nanoparticles を加えます。
Magnetic Nanoparticles (緑色のキャップ) は、使用前に十分に再懸濁してください。

Reagents	Plasma/serum volume		
	1 mL	2 mL	5 mL
cfDNA Lysis/Binding Solution	1.25 mL	2.5 mL	6.25 mL
Magnetic Nanoparticles	15 uL	30 uL	75 uL

5. ボルテックスまたは転倒混和 10 回により混合します。

過度なボルテックスにより、泡を発生させないようにします。

6. シェーカー(振盪速度:中~速)で10分間振盪混和します。
7. 反応チューブを磁気スタンド上で5分間静置し、溶液中の磁性ナノ粒子を分離します。
8. 反応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。

C. cfDNA Wash Solution での洗浄

9. 反応チューブを磁気スタンド上から下ろし、cfDNA Wash Solution を1 mL 加え、ボルテックスで磁性ナノ粒子を再懸濁します。
10. 懸濁液を、新しい1.5 mL マイクロチューブに移します。

もとの15 mL コニカルチューブは一時保存します。

11. 反応チューブ(1.5 mL マイクロチューブ)を磁気スタンド上で1分間静置し、溶液中の磁性ナノ粒子を分離します。
12. 反応チューブ(1.5 mL マイクロチューブ)を磁気スタンド上に置いたままで、上清を一時保存しておいた15 mL コニカルチューブに入れ、残った磁性ナノ粒子を懸濁し、懸濁液を1.5 mL マイクロチューブに戻します。15 mL コニカルチューブは破棄します。

13. 反応チューブ(1.5 mL マイクロチューブ)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、溶液中の磁性ナノ粒子を分離します。
14. 反応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。
15. 反応チューブを磁気スタンド上から下ろし、cfDNA Wash Solution を1 mL 加え、ボルテックスで30秒間再懸濁します。
16. 反応チューブを軽く遠心分離し、懸濁液を底部に落とします。
反応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、溶液中の磁性ナノ粒子を分離します。
17. 反応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。

D. cfDNA 2nd Wash Solution での洗浄

18. 予め cfDNA 2nd Wash Solution と100%エタノールを1:4で混合しておきます。最終濃度は20% cfDNA 2nd Wash Solution / 80%エタノールとなり、1サンプルあたり2 mL 使用します。
19. 反応チューブを磁気スタンド上から下ろし、cfDNA 2nd Wash Solution を1 mL 加え、ボルテックスで30秒間再懸濁します。

20. 反応チューブを軽く遠心分離し、懸濁液を底部に落とします。

反応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、溶液中の磁性ナノ粒子を分離します。

21. 反応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。

22. 19.~21.のステップを繰り返し行い、合計 2 回の cfDNA 2nd Wash Solution 洗浄を行います。

23. 反応チューブを軽く遠心分離し、懸濁液を底部に落とします。

反応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、溶液中の磁性ナノ粒子を分離します。

24. 反応チューブを磁気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。

25. 反応チューブを磁気スタンド上に置いたままで、磁性ナノ粒子を 3 分間乾燥させます。

湿度が高い場合は、乾燥時間を延長することも可能です。エタノールが残留している場合、溶出効率を低下させる場合があります。

E. 磁性ナノ粒子からの cfDNA の溶出

26. 反応チューブを磁気スタンド上から下ろし、下表の通りに cfDNA Elution Solution (青色のキャップ)を加えます。

Plasma/serum volume	1 mL	2 mL	5 mL
Suggested cfDNA Elution Solution Volume	20 uL	40 uL	100 uL

27. ボルテックスで再懸濁し、cfDNA を磁性ナノ粒子から解離するためにさらにボルテックスで 5 分間攪拌します。

28. 反応チューブを軽く遠心分離し、懸濁液を底部に落とします。

反応チューブを磁気スタンド上で上清が透明になるまで静置し、溶液中の磁性ナノ粒子を分離します。

29. 反応チューブを磁気スタンド上に置いたままで、精製 cfDNA を含む上清を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移します。

30. 精製 cfDNA は、短期間の場合は 4°Cで、長期間の場合は-20°Cで保存します。

31. cfDNA の評価や定量を行う場合には、検出感度の高い (5 pg/μL) Agilent Technologies 社

Bioanalyzer 2100 + High Sensitivity DNA Analysis Kit の使用をお薦めします。

220526_QMJ_MiniMaxcfDNA

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>

