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℃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℃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℃以下で再溶解してください。
cfDNA 2nd 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

例：Bioneer MagListo™-15 Magnetic Separation Rack, TM-1020

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 SPRIStand 6 Position Tube Magnet, A29182

試薬

100%エタノール

機器類

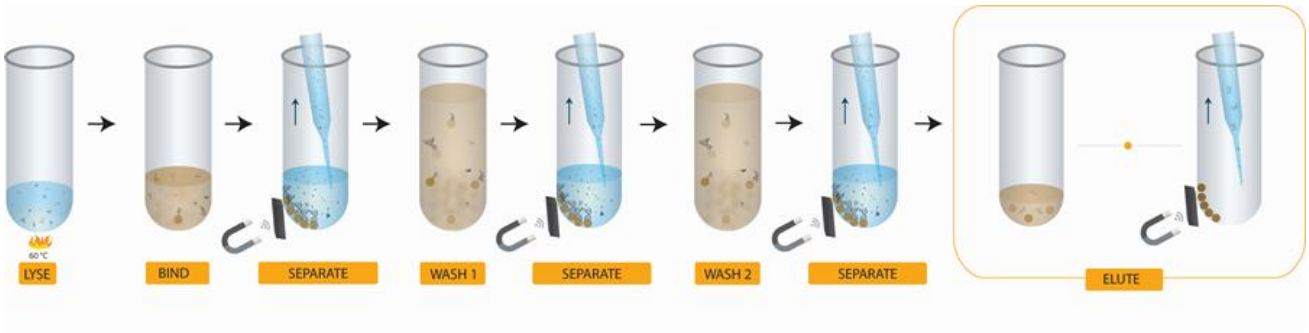
ボルテックス

シェーカー

37℃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℃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 分間撹拌します。

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℃で、長期間の場合は-20℃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。

230714_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　FAX 03-5530-2460
e-mail bckkcas@beckman.com　URL http://www.beckmancoulter.co.jp