

## GenFind v3 追加プロトコル FTA card／ろ紙血からの DNA 抽出



本追加プロトコルは簡易版です。使用前には、正式な製品マニュアルと Supplemental Protocol (英文)を必ずご一読ください。

FTA card／ろ紙血に保存された血液サンプルから、ゲノム DNA を抽出します。

### Material Supplied by the User

2 mL 96 ウェルプレート

例: Beckman Coulter, 609681

V&P Scientific 7 Bar Magnet for 96-Well Plate, 771MWZM-1ALT

Sigma-Aldrich Whatman® 903 Protein saver card, WHA10534612

### 試薬

100%エタノール

ヌクレアーゼフリー水

### Wash WBC 溶液の調製

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。

## Purification Procedure

### 1. サンプル調製

- a. 血液スポットを切り出し、2 mL 96 ウェルプレートに移します。  
2.54×1.27 cm の円形パンチに血液 50  $\mu$ L が含まれるサンプルの抽出例を、Example Data の項で示します。

### 2. 溶解

- a. Lysis LBB 500  $\mu$ L を加えます。
- b. Proteinase K 30  $\mu$ L を加えます。
- c. ピペティング 10 回により混合します。
- d. 室温で 1 時間反応します。

### 3. 結合

- a. Bind BBB のボトルをボルテックスし、磁性ビーズを完全に再懸濁します。
- b. 血液スポットを持ち込まないようにして、サンプルを別のプレートに移します。
- c. Bind BBB 300  $\mu$ L を加え、混合します。
- d. 室温で 5 分間静置します。
- e. 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。
- f. 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。
- g. 反応プレートを磁気プレートから下ろします。

### 4. 洗淨

- a. Wash WBB 800  $\mu$ L を加えます。
- b. ピペティング 10 回により混合します。
- c. 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。
- d. 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。
- e. 反応プレートを磁気プレートから下ろします。
- f. 4.a~4.e のステップを繰り返し行い、合計 2 回の Wash WBB 洗淨を行います。
- g. Wash WBC 溶液 800  $\mu$ L を加えます。
- h. ピペティング 10 回により混合します。
- i. 反応プレートを磁気プレート上で 6 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- j. 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。

- k. 反応プレートを磁気プレートから下ろします。
- l. 4.g~4.k のステップを繰り返し行い、合計 2 回の Wash WBC 洗浄を行います。

## 5. 溶出

- a. ヌクレアーゼフリー水 40  $\mu$ L を加え、混合します。
- b. 室温で 2 分間静置します。
- c. 反応プレートを磁気プレート上で 2 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- d. 溶出 DNA を含む上清を、新しい保存用プレートに移します

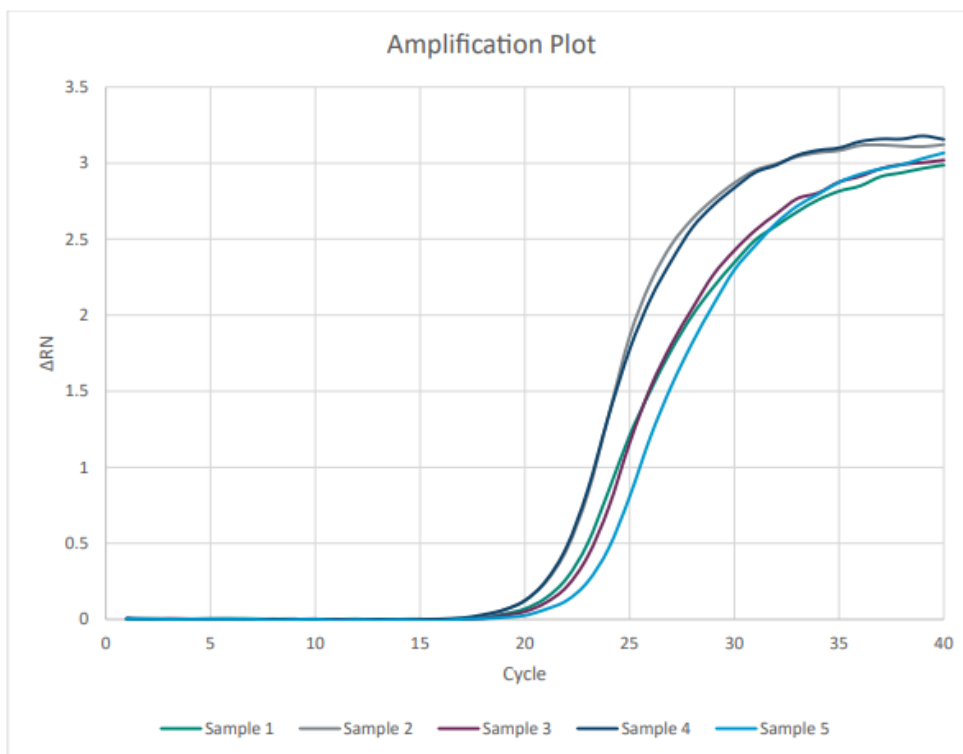


## Example Data

Whatman® 903 Protein saver card で保存した血液スポットからゲノム DNA を抽出しました。血液 50  $\mu$ L が含まれるスポットは、室温 (23°C) で 34 日間保存後に、本追加プロトコルで DNA を抽出しました。DNA 濃度は Quant-iT DNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific) で測定しました (n=5)。平均収量は  $82 \pm 38$  ng、平均濃度は 2.05 ng/ $\mu$ L であり、以前に発表された論文と同様であった (Table 1; Saavedra-Matiz *et al*, 2013)。PCR 阻害剤の除去精製を確認するため、 $\beta$ -アクチン遺伝子 (ActB) のエクソン 4 および 5 にまたがるように設計されたプライマーセット (forward primer 5'-ggacttcgagcaagagatgg-3' および reverse primer 5'-agcactgtgtggcgtacag-3') で 327 bp を増幅する qPCR を行いました。サンプル 2 と 4 は、増幅プロットに対応した高い DNA 濃度でした (Table 1 and Figure)。

Sample	Yield (ng)
1	74.6
2	111.9
3	67.2
4	134.4
5	23.6

**Table 1.** The yield of DNA extracted from 5 replicate dried blood spots as measured by using Quant-iT DNA assay kit.



**Figure.** The amplification plot of the 5 samples. An estimated 20ng of DNA was used and the Ct values averaged at 19.7 with a standard deviation of 0.75 and a negative control had a Ct value of 34.9, indicating that PCR inhibitors removal from the sample during the extraction process.

## References

Saavedra-Matiz, C.A., Isabell, J.T., Biski, C.K., Duva, S.J., Sweeney, M.L, Parker, A.L., Young, A.J., DiAntonio, L.L., Krein, L.M., Nichols, M.J., Caggana, M. Cost-effective and scalable DNA extraction method from dried blood spots. *Clinical Chemistry*. 2013. 59(7): 1045-51.

210217\_SP-JP\_GenFindV3\_BloodspotDNA

## 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>

