

# AGENCOURT DNAdvance™

## Genomic DNA Isolation Kit プロトコール

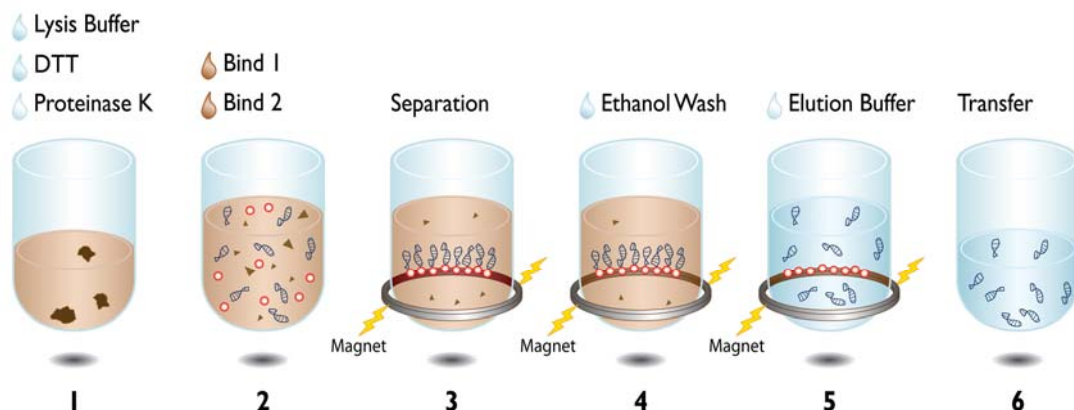
### ● はじめに

Agencourt DNAdvance Kit は組織からゲノム DNA を抽出する試薬キットで、多検体処理に効力を発揮します。本プロトコールは 96 ウェルフォーマットで行う、マウステールの凍結もしくは新鮮な組織からの DNA 抽出・精製法です。抽出は、まずマウステールに Lysis Buffer、DTT、と Proteinase K を加え、細胞膜を破壊し、タンパク質を分解するステップから始まります。続いて SPRI 磁性ビーズを含む Binding 試薬を加えることで、DNA は磁性ビーズに結合します。その後、磁石で磁性ビーズをトラップし、共雑物のみを除去します。続いて単純な洗浄ステップを経て、DNA を磁性ビーズから溶出します。DNAdvance は独自の SPRI 磁性ビーズを用いた抽出法を採用しているため、真空ろ過や遠心の必要が無く、弊社ラボラトリーオートメーションシステム Biomek による自動化処理に最適な試薬です。

DNAdvance™ Kit で抽出した DNA は下記アプリケーションに使用可能です：

- ジェノタイピング
- PCR 反応
- フラグメント解析
- 制限酵素処理
- アガロースゲル電気泳動
- メンブレンハイブリダイゼーション など

### ● DNA 抽出・精製プロセスの概要



1. Lysis Buffer、DTT および Proteinase K で、20 mg までのマウステールもしくは組織切片を溶解する。
2. ゲノム DNA を磁性ビーズに結合させる。
3. 磁場でビーズを集め、澱雑物のみを除く。
4. 70 %エタノールで澱雑物のみを除く。
5. 磁性ビーズからゲノム DNA を溶出する。
6. 溶出液を新たなプレートに移す。

● キットの保存条件

試薬	キット到着後の保存状態
Lysis Buffer	室温
Proteinase K	-20 °C
Proteinase K Buffer	室温
Bind1 Buffer	室温
Bind2 Buffer	4 °C : 凍結させないこと
Elution Buffer (12 mM Tris pH 8.0)	室温

製造後、6 ヶ月使用可能です。

● マグネットアクセサリ等、その他必要なもの

①専用マグネットアクセサリ

SPRI Plate 96R Ring Super Magnet Plate (ベックマン・コールター A32782)

②96 ウェルプレート

96 well 1.2 mL magnet compatible deepwell block (ABGene AB-1127)、もしくは同等品

③96 ウェル用シール

96 Cap Sealing Mat (ABGene AB-0662)、もしくは同等品

④インキュベーターシェーカー

New Brunswick Scientific C25、もしくは同等品 (55 °C/100 rpm での設定が可能なもの)

⑤試薬

100 %エタノール

1M DTT

● 操作法 (20 mg 以下の検体を用いる場合)

DNAdvance はマウステールからの DNA 抽出用に開発されましたが、検体はマウステールに限りません。また本プロトコールはマニュアル法用であり、Biomek を用いて自動化する場合は改変が必要になります。

コンタミネーションを回避するために、DNAdvance による DNA 抽出・精製を行う際にはフィルター付きチップの使用を強く推奨します。

1. 終濃度 40 mg/mL となるように、Proteinase K の容器に PK Buffer を下記の通り添加し、-20 °C で保存する。

A48705 DNAdvance Kit - Small (384 preps)	3.25 mL
A48706 DNAdvance Kit - Large (9,600 preps)	81 mL

2. 20 mg (10 mm のマウステールに相当する) 以下の組織を切り刻み、96 ウェルプレート (以下プレート) の各ウェルに入れる。

組織を細かく切り刻むことで、組織の溶解が促進される。室温での調整で構わない。

10~20 mg の凍結サンプルの場合は、Lysis マスターミックスを加える前に、37 °C で 30 分インキュベートする。

3. 1 サンプル辺り下記の容量となるように、サンプル数分の Lysis マスターミックスを作成する。

試薬	容量 (μL)
Lysis Buffer	188
1 M DTT	5
Proteinase K (40 mg/mL)	7

4. 各ウェルに 200 μL の Lysis マスターミックスを加えた後、プレートをシールする。

5. インキュベーターシェーカーを用い、100 rpm/55 °C の条件で、プレートをオーバーナイト (18~20 時間) でインキュベートする。

振とうしながら 55 °C でのインキュベーションにより、Proteinase K によるタンパク質分解が促進される。ウェル内の溶液を蒸発させないために、プレートのシールの上におもりになるものをのせると良い。10 mg 以下のマウステールの場合は、37 °C で 30 min のインキュベートしたうえで Lysis マスターミックスを添加し、その後 4 時間のインキュベーションで溶解し得る。

6. プレートをインキュベーターシェーカーから取り出す。
7. プレートからシールをはがす前に、結露した Lysis マスターミックスをスピンドウンする。  
これ以降の操作をすぐに行わない場合は、この段階でのプレートを-80 °Cで凍結保存する。
8. ライゼートを新しいプレートに移す。
9. 100  $\mu$ L の Bind1 Buffer をそれぞれのウェルに加え、10 回もしくは十分混和するまでピペッティングする。
10. 磁性ビーズが十分均一になるまで、Bind2 Buffer を転倒混和する。
11. 170  $\mu$ L の Bind2 Buffer をそれぞれのウェルに加え、15 回もしくは十分混和するまでピペッティングする。  
このステップで DNA が磁性ビーズに結合する。混和の際、ウェル内の全溶液量より若干少ない量で穏やかにピペッティングすることにより、泡の発生を最小限にする。泡は磁性ビーズをトラップし、結果的に DNA の収率が落ちる。
12. 室温で 1 分間、プレートを静置する。
13. SPRI Plate 96R Ring Super Magnet Plate (A32782、以下 Ring Super Magnet Plate) 上に室温で 4 分間、プレートを静置する。
14. Ring Super Magnet Plate 上にプレートを設置したまま、上清を取り除く。  
ピペットを垂直に、またウェルの中心に下ろすことで、ウェルの周囲にリング状に形成された磁性ビーズの帯にピペットが触れないようにする。
15. プレートを Ring Super Magnet Plate から外す。続いて 340  $\mu$ L の 70 %エタノールを加え、20 回もしくは磁性ビーズが十分リサスペンドされるまでピペッティングを繰り返す。  
70 %エタノールは用事調整した新鮮なものを用いる。
16. 再び Ring Super Magnet Plate 上にプレートを設置し、1 分間もしくは溶液が透明になるまで静置する。

17. Ring Super Magnet Plate 上にプレートを設置したまま、上清を取り除く。  
ウェルの周囲にリング状に形成された磁性ビーズの帯にピペットが触れないようにする。
18. 15～17までのステップをさらに2回繰り返し、合計3回のエタノール洗浄を行う。
19. DNA 溶出のステップ前に、可能な限りエタノールを取り除く。
20. プレートを Ring Super Magnet Plate から外す。続いて 200  $\mu$ L の Elution Buffer を加え、10 回もしくは磁性ビーズが十分リサスペンドされるまでピペッティングする。
21. 再び Ring Super Magnet Plate 上にプレートを設置し、5 分間もしくは溶液が透明になるまで静置する。
22. 190  $\mu$ L の上清を回収する。  
回収は穏やかに、またウェルの周囲にリング状に形成された磁性ビーズの帯にピペットが触れないようにする。上清 200  $\mu$ L すべてを回収した場合、磁性ビーズのキャリーオーバーのリスクが高まる。もし磁性ビーズも回収してしまった場合は、回収した上清をもとのウェルに戻し、5 分間置いたうえで DNA を再回収する。
23. DNA を下流のアプリケーションで解析するまでは  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存する。

以上