

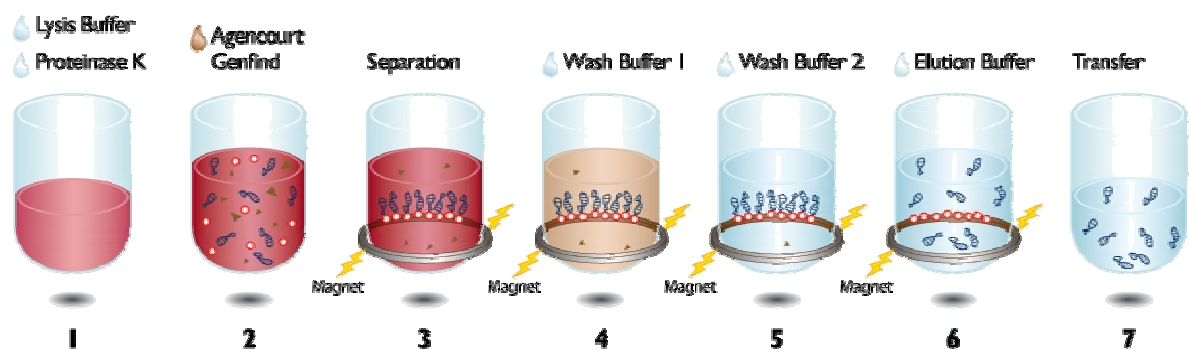
Agencourt Genfind v2 Kit プロトコール

はじめに

Agencourt Genfind v2 は、新鮮もしくは凍結保存の全血もしくは血清からゲノム DNA を抽出精製する試薬で、抗凝血剤（クエン酸塩、EDTA やヘパリン）を含む全血もしくは血清にも有効です。96 ウェルプレート使用、もしくはチューブ使用のどちらのプロトコールにも対応しますが、それぞれのプロトコール（それぞれ A もしくは B のプロトコール）がありますので下記にご確認ください。

いずれの場合も、まず Lysis Buffer および Proteinase K により細胞膜を破壊し、タンパク質を分解します。次に Binding Buffer を添加することで、DNA を SPRI 磁性ビーズ上に集約させます。続いて磁気で SPRI 磁性ビーズをトラップし、洗浄ステップで共雑物を十分除去したのち、DNA を溶出します。

プロトコールの概要



1. Lysis Buffer および Proteinase K で全血もしくは血清を溶解する。
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、上清のみを除く。
4. Wash Buffer I で上清のみを除く。
5. さらに Wash Buffer II で上清のみを除く。
6. 磁性ビーズからゲノム DNA を溶出する。
7. 溶出液を新たなチューブもしくはプレートに移す。

	チューブ用キット(50反応分) A41501/A41499	96ウェルプレート用キット(4X96反応分) A41497/A41500
200uL サンプル	100反応	384反応
400uL サンプル (チューブ用プロトコールのみ)	50反応	192反応

キット内容物の保存条件

試薬	キット到着後の保存状態
Lysis Buffer	室温
Proteinase K	-20℃
Proteinase K Buffer	室温
Binding Buffer	4℃:凍結させないこと
Wash Buffer 1	室温:冷蔵しないこと。加熱しないこと
Wash Buffer 2	室温

A. 96 ウェルプレートでの DNA 抽出・精製プロトコール

凍結サンプルの場合は、室温又は 37℃で溶解したうえで、事前に良く混合する。

Genfind v2は 96 ウェルプレート（ABGeneの1.2mLディープウェルプレート #AB-1127を使用する）を用いた場合、最大容 200uL の全血・血清からゲノムDNA を抽出精製することができる。下記プロトコールは 200uL のサンプルを用いる場合に添加する試薬量を示しているが、より少量のサンプルで抽出精製を行う場合は 200uL との容量比にあわせて必要量を添加する。

コンタミネーションを回避するために、Genfind v2 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) キット初回使用時のみのステップ：下記用量で Proteinase K に専用バッファー (PK Buffer) を加え、よく溶解する（高濃度の溶液のため、泡立ちに気をつけながら溶解する）。溶液はマイナス 20℃で保存する。また、Wash Buffer 2 に 100%エタノールを下記用量で加える。よく混和し、室温に保存する。

	プロテナーゼK溶液	Wash Buffer 2
	プロテナーゼKに加えるPK Buffer量	Wash Buffer ボトルに加える 100%エタノール
Tube用キット (A41499およびA41501)	1mL	105mL
Plate用キット (A41497およびA41500)	1mL	375mL
調整後の保存状態	-20℃	室温

*ステップ (1) はキット初回使用時のみのステップ。2回目以降のキット使用は下記ステップ 1 より始める。

1. 採血管を緩やかに転倒混和した後、200uL のサンプルを 96 ウェルプレートの各ウェルに分取する。

*穏やかに転倒混和をすることが回収量の増加につながるが、ピペッティングやボルテクスによる混和は避ける。96 ウェルプレートは、各ウェルの底がリングマグネットに直接触れるものを使用する。理想的には、各ウェルが丸底になっているプレートを選択する。

2. 400uL (もしくはサンプル量の 2 倍容) の Lysis Buffer と 9uL (もしくは初期サンプル量の 0.045 倍容) の Proteinase K 溶液 (96ug/uL) を加える。穏やかにピペッティングを 10 回繰り返し (もしくは溶液が均一になるまで)、良く混和する。

*ステップ（1）で調整した Proteinase K 溶液（96ug/uL）を用いる。ピペッティングの際には、泡の発生を極力抑えること。

3. 37°Cで10分間、もしくは室温で30分間インキュベートする。

4. **重要：Binding Buffer のボトルを20回ほど転倒混和し、SPRI 磁性ビーズを均一な混合状態にする。**そのうえで、300uL（もしくは初期サンプルの1.5倍容）の Binding Buffer を加え、ピペッティングを穏やかに10回繰り返す（もしくは溶液が均一になるまで）、良く混和する。

*このステップで SPRI 磁性ビーズに DNA が結合する。ピペッティングの際には、泡の発生を極力抑えること。泡は SPRI 磁性ビーズをトラップし、DNA との結合を阻害するため、回収量の低下につながる。

5. 室温で5分間静置する。

6. SPRIPlate 96 Ring Super magnet 上に96ウェルプレートとを15分静置する。

*溶液は濃い茶色の懸濁液であるため、ウェル底部で「ビーズの輪」が形成されているのを目視するのは難しいが、15分間静置すれば、確かにビーズの輪は形成される。

7. 96ウェルプレートを Ring Super magnet 上に置いたまま、SPRI 磁性ビーズに触れないように上清を除く。

*容量が多いため、上清の除去には複数回のピペッティングが必要になる。上清が少なくなるまではウェル底部の「ビーズの輪」を目視することは難しいが、ピペットのチップをウェルの中心に入れることで、SPRI 磁性ビーズに触れないように注意する。

8. 96ウェルプレートを Ring Super magnet から離す。そのうえで、800uL（もしくは初期サンプル量の4倍容）の Wash Buffer 1 を加え、ピペッティングを10回繰り返す（もしくは磁性ビーズが混合されるようになるまで）、良く混和する。

*ほとんどの磁性ビーズがリサスペンドされるまでピペッティングを行う。若干のビーズはウェル底部に残ったままになるか、リサスペンドしても塊になることもある。また、使用時に Wash Buffer 1 に白い沈殿物が見られることがあるが、沈殿物が溶解するまで穏やかに混和する。決して加熱してはいけない。

9. Ring Super magnet 上に96ウェルプレートに戻し、10分間もしくは溶液が透明になるまで静置する。

*上清は血液成分の残渣により茶色の場合がある。

10. 96ウェルプレートを Ring Super magnet 上に置いたまま、SPRI 磁性ビーズに触れない

ように上清をピペットで除く。

1 1. Wash Buffer 1 による磁性ビーズの洗浄（8 から 1 0 までのステップ）をもう一度繰り返す。

*二度目の洗浄では、一度目の洗浄ほどには磁性ビーズは凝集しないことが多い。Wash Buffer 1 は分解されたタンパク質の除去を促進するため、この洗浄ステップでの十分な混和は特に重要である。もし十分な混和が行われなかった場合は、溶出段階において磁性ビーズが凝集し、溶出液の回収が困難となる。

1 2. 96 ウェルプレート **Ring Super magnet** から離す。そのうえで、500uL（もしくは初期サンプル量の 2.5 倍容）の Wash Buffer 2 を加え、ピペッティングを 10 回繰り返し（もしくは磁性ビーズが十分混合されるようになるまで）、良く混合する。

1 3. **Ring Super magnet** 上に 96 ウェルプレートに戻し、6 分間もしくは溶液が透明になるまで静置する。

1 4. 96 ウェルプレート **Ring Super magnet** 上に置いたまま、SPRI 磁性ビーズに触れないように上清を除く。

1 5. Wash Buffer 2 による磁性ビーズの洗浄（1 2 から 1 4 までのステップ）をもう一度繰り返す。

1 6. 96 ウェルプレート **Ring Super magnet** 上に置いたまま、磁性ビーズに触れないように上清をピペットですべて除く。

1 7. 96 ウェルプレート **Ring Super magnet** から離す。そのうえで、
全血の場合：200uL の溶出液（DNase フリー水またはその後の解析に適切なバッファー）を加える。

血清の場合：（初期サンプル量に寄らず）40uL の溶出液（DNase フリー水またはその後の解析に適切なバッファー）を加える。

*高濃度の DNA 溶出液が必要な場合は加える溶出液量を減らす。磁性ビーズが乾燥すると DNA の溶出が効率的に行えなくなるため、磁性ビーズを乾燥させ過ぎないように注意すること。もし磁性ビーズの湿り気が強い場合は、室温で 5 分間ほど放置する。磁性ビーズにヒビが入る前に溶出液を加えること。

1 8. ピペッティングにより溶出液に SPRI 磁性ビーズを良くリサスペンドする。室温で 2 分間静置後、再度ピペッティング繰り返し、溶出液と磁性ビーズを良く混和する。

19. Ring Super magnet 上に 96 ウェルプレートに戻し、10 分間あるいは溶液が透明になるまで静置する。その後、Ring Super magnet 上に 96 ウェルプレートを置いたままで、
全血の場合：磁性ビーズのキャリーオーバーのリスクを減らすため、25uL をウェルに残し、
溶出液を回収する。

血清の場合：すべての溶出液を回収する。

*回収時に磁性ビーズもピペッティングしてしまった場合、分取した溶出液を一旦もとのウェルに戻し、
改めて 10 分 Ring Super magnet 上に静置する。そのうえで、再度溶出液を回収する。なお、回収時、ピペッ
トのチップをウェルの中心に入れ、SPRI 磁性ビーズに触れないように注意する。

B. チューブを用いた DNA 抽出・精製プロトコール

凍結サンプルの場合は、室温又は 37℃で溶解したうえで、下記操作を行う前に良く混合する。Genfind v2 は 2mL チューブを用いた場合、最大容 400uL の全血・血清からゲノム DNA を抽出精製することができる。下記プロトコールは 400uL のサンプルを用いる場合に添加する試薬量を示しているが、より少量のサンプルで抽出精製を行う場合は 400uL との容量比にあわせて必要量を添加する。

コンタミネーションを回避するために、Genfind v2 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) キット初回使用時のみのステップ：下記用量で Proteinase K に専用バッファー (PK Buffer) を加え、よく溶解する (高濃度の溶液のため、泡立ちに気をつけながら溶解する)。溶液はマイナス 20℃で保存する。また、Wash Buffer 2 に 100%エタノールを下記用量で加える。よく混和し、室温に保存する。

	プロテナーゼK溶液	Wash Buffer 2
	プロテナーゼKに加えるPK Buffer量	Wash Buffer ボトルに加える 100%エタノール
Tube用キット (A41499およびA41501)	1mL	105mL
Plate用キット (A41497およびA41500)	1mL	375mL
調整後の保存状態	-20℃	室温

*ステップ (1) はキット初回使用時のみのステップ。2回目以降のキット使用は下記ステップ 1 より始める。

1. 採血管を緩やかに転倒混和した後、400uL のサンプルを 2mL チューブに分取する。

*穏やかに転倒混和をすることが回収量の増加につながるが、ピペッティングやボルテクスによる混和は避ける。

2. 800uL (もしくはサンプル量の 2 倍容) の Lysis Buffer と 18uL (もしくは初期サンプル量の 0.045 倍容) の Proteinase K 溶液 (96ug/uL) を加える。穏やかにピペッティングを 10 回繰り返す (もしくは溶液が均一になるまで)、良く混和する。

*ステップ (1) で調整した Proteinase K 溶液 (96ug/uL) を用いる。ピペッティングの際には、泡の発生を極力抑えること。

3. 37°Cで10分間、もしくは室温で30分間インキュベートする。

4. **重要** : Binding Buffer のボトルを 20 回ほど転倒混和し、SPRI 磁性ビーズを均一な混合状態にする。そのうえで、600 μ L (もしくは初期サンプルの 1.5 倍容) の Binding Buffer を加え、ピペッティングを穏やかに 10 回繰り返す (もしくは溶液が均一になるまで)、良く混和する。

*このステップで SPRI 磁性ビーズに DNA が結合する。ピペッティングの際には、泡の発生を極力抑えること。泡は SPRI 磁性ビーズをトラップし、DNA との結合を阻害するため、回収量の低下につながる。

5. 室温で5分間静置する。

6. SPRIstand にチューブを置き、15分間静置する。

*溶液は濃い茶色の懸濁液であるため、ウェル側部にビーズが集約されているのを目視するのは難しいが、15分間静置すれば、確かにビーズは集約される。

7. チューブを SPRIstand に置いたまま、SPRI 磁性ビーズに触れないように上清を除く。

*容量が多いため、上清の除去には複数回のピペッティングが必要になる。上清が少なくなるまではウェル側部のビーズを目視することは難しいが、SPRI 磁性ビーズに触れないように、ビーズとは反対側のウェル側部から上清を取り除く。

8. チューブを SPRIstand から離す。そのうえで、1.6mL (もしくは初期サンプル量の 4 倍容) の Wash Buffer 1 を加え、ピペッティングを 10 回繰り返す (もしくは磁性ビーズが混合されるようになるまで)、良く混和する。

*ほとんどの磁性ビーズがリサスペンドされるまでピペッティングを行う。若干のビーズはチューブ側部に残ったままになるか、リサスペンドしても凝集したままのこともある。また、使用時に Wash Buffer 1 に白い沈殿物が見られることがあるが、沈殿物が溶解するまで穏やかに混和する。決して加熱してはいけない。

9. SPRIstand にチューブを戻し、2分間もしくは溶液が透明になるまで静置する。

*上清は血液成分の残渣により茶色の場合がある。

10. SPRIstand にチューブを置いたまま、SPRI 磁性ビーズに触れないように上清をピペットで除く。

11. Wash Buffer 1 による磁性ビーズの洗浄 (8 から 10 までのステップ) をもう一度繰

り返す。

*二度目の洗浄では、一度目の洗浄ほどには磁性ビーズは凝集しないことが多い。Wash Buffer 1 は分解されたタンパク質の除去を促進するため、この洗浄ステップでの十分な混和は特に重要である。もし十分な混和が行われなかった場合は、溶出段階において磁性ビーズが凝集し、溶出液の回収が困難となる。

1 2. チューブを SPRIstand から離す。そのうえで、1mL（もしくは初期サンプル量の 2.5 倍容）の Wash Buffer 2 を加え、ピペッティングを 10 回繰り返す（もしくは磁性ビーズが十分混合されるようになるまで）、良く混合する。

1 3. チューブを SPRIstand に戻し、6 分間もしくは溶液が透明になるまで静置する。

1 4. チューブを SPRIstand に置いたまま、SPRI 磁性ビーズに触れないように上清を除く。

1 5. Wash Buffer 2 による磁性ビーズの洗浄（1 2 から 1 4 までのステップ）をもう一度繰り返す。

1 6. チューブを SPRIstand に置いたまま、磁性ビーズに触れないように上清をピペットでできるだけすべて除く。

1 7. チューブを SPRIstand から離す。そのうえで、

全血の場合：400uL の溶出液（DNase フリー水またはその後の解析に適切なバッファー）を加える。

血清の場合：（初期サンプル量に寄らず）40uL の溶出液（DNase フリー水またはその後の解析に適切なバッファー）を加える。

*高濃度の DNA 溶出液が必要な場合は加える溶出液量を減らす。磁性ビーズが乾燥すると DNA の溶出が効率的に行えなくなるため、磁性ビーズを乾燥させ過ぎないように注意すること。もし磁性ビーズの湿り気が強い場合は、室温で 5 分ほど放置する。磁性ビーズにヒビが入る前に溶液を加えること。

1 8. ピペッティングにより溶出液に SPRI 磁性ビーズを十分にリサスペンドする。室温で 2 分間静置後、再度ピペッティング繰り返す、溶出液と磁性ビーズを良く混和する。

1 9. チューブを SPRIstand に戻し、5 分間あるいは溶液が透明になるまで静置する。その後、チューブを SPRIstand 上に置いたまま、溶出液を回収する。

*回収時に磁性ビーズもピペッティングしてしまった場合、分取した溶出液を一旦もとのチューブに戻し、改めて 10 分間 SPRIstandt 上に静置する。そのうえで、再度溶出液を回収する。なお、回収時に SPRI 磁性ビーズに触れないように、磁性ビーズとは反対側のチューブ側面から溶出液を分取する。