

Agencourt Genfind v2

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

ベックマン・コールターのスリッドフェーズ可逆的固定化 (SPRI) 磁性ビーズ技術により、血液 (凍結/非凍結の、凝固剤入り全血/血清) からの DNA 抽出に対応します。本プロトコルでは全血/血清 200 μ L をサンプルとして 96 ウェルプレートを用いた抽出方法、および全血/血清 400 μ L をサンプルとして 2 mL チューブを用いた抽出方法を解説します。

適用アプリケーション

アガロースゲル解析、PCR、制限酵素処理、メンブレン上でのハイブリダイゼーション解析 (サザンブロット・ドットブロットなど)、AFLP・RFLP・RAPD・マイクロサテライト・SNP を用いたジェノタイプング/フィンガープリンティング解析

保存方法

Lysis Buffer	室温保存
Binding Buffer	4°C 保存
Wash 1	室温保存
Wash 2	室温保存
PK Buffer	室温保存
Proteinase K	-20°C 保存

本マニュアルの対応製品

A41499 Genfind v2 50 preps

A41497 Genfind v2 384 preps

Material Supplied by the User

96 ウェル反応プレートの場合

96 ウェル 1.2 mL ディープウェルブロック

A32782 Agencourt SPRIPlate 96R Ring Super Magnet Plate

2mL チューブの場合

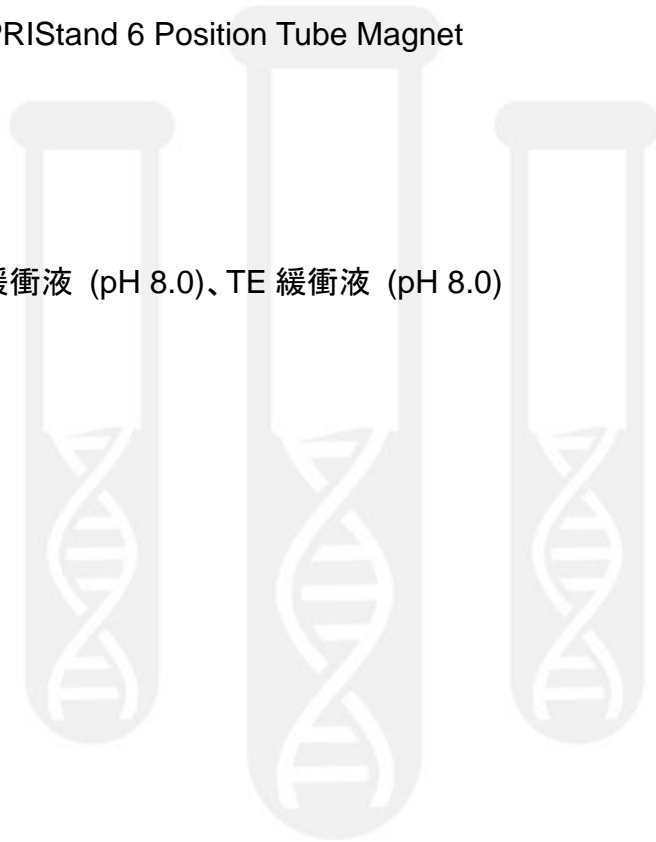
2 mL マイクロチューブ

A29182 Agencourt SPRIStand 6 Position Tube Magnet

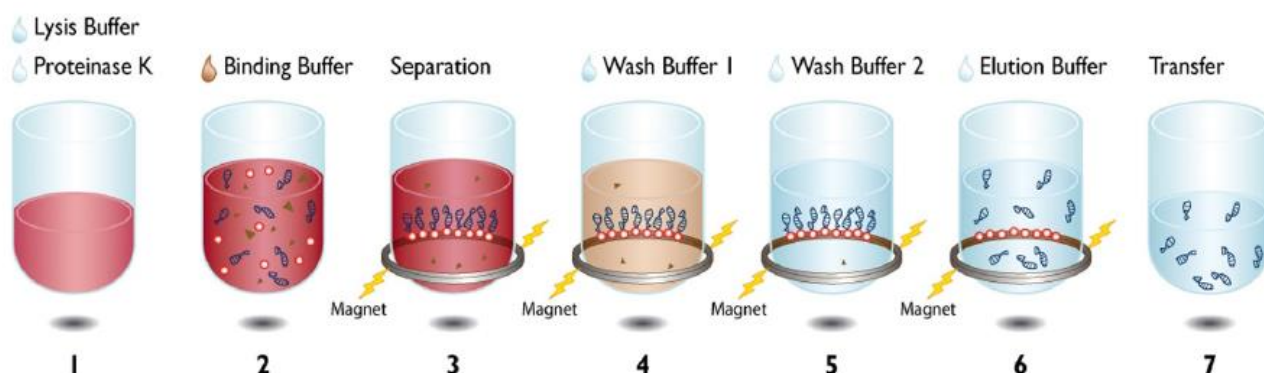
試薬

100%エタノール

溶出液: 滅菌水、Tris 緩衝液 (pH 8.0)、TE 緩衝液 (pH 8.0)



Quick Reference (全血/血清 200 μ L、96 ウェル反応プレートの場合)



1. 全血・血清サンプル 200 μ L、Lysis Buffer 400 μ L、Proteinase K 溶液 9 μ L をピペッティング 10 回により混合し、37°Cで 10 分間、または室温で 30 分間反応。
2. Binding Buffer 300 μ L を加え、ピペッティング 10 回により混合し、室温で 5 分間静置。
3. 磁気プレート上で 15 分間静置後、上清を除去。
4. 磁気プレートから下ろし、Wash 1 800 μ L を加え、ピペッティング 10 回で再懸濁。磁気プレート上で 10 分間静置し、上清を除去。この Wash 1 洗浄を再度繰り返す。
5. 磁気プレートから下ろし、Wash 2 溶液 500 μ L を加え、ピペッティング 10 回で再懸濁。磁気プレート上で 6 分間静置し、上清を除去。この Wash 2 溶液洗浄を再度繰り返す。
6. 磁気プレート上で、全血サンプルの場合は溶出液 200 μ L、血清サンプルの場合は溶出液 40 μ L を添加。磁気プレートから下ろし、ピペッティングで十分に再懸濁し、室温で 2 分間静置により DNA を溶出。磁気プレート上で 10 分間静置。
7. 溶出 DNA を保存用プレートに移す。全血サンプルの場合は、溶出液のうち 25 μ L を元のプレートに残す。

Purification Procedure

全血/血清 200 μ L 以下、96 ウェル反応プレートでの実験手順

凍結または非凍結の、凝固剤入り全血または血清の血液サンプルに対応します。凍結サンプルは、室温または 37°C で解凍し、十分に転倒混和します。

1. 96 μ g/ μ l Proteinase K 溶液と Wash 2 溶液を調製します。

Proteinase K のボトルに、PK Buffer を 50 preps、384 preps いずれの場合も 1 mL 加え、混合します。調製後の溶液は、-20°C で保存します。

Wash 2 のボトルに、100%エタノールを 50 preps の場合は 105 mL、384 preps の場合は 375 mL 加え、混合します。調製後の溶液は、室温で保存します。

2. 血液サンプルを数回転倒混和します。ピペッティングやボルテックスで攪拌は推奨しません。200 μ L 以下の血液サンプルを 1.2 mL ウェルサイズの 96 ウェル反応プレートに入れます。
3. Lysis Buffer 400 μ L (200 μ L の場合; サンプルの 2 倍容) と Proteinase K (96 μ g/ μ l)溶液 9 μ L (200 μ L の場合; サンプルの 0.045 倍容) とを加え、ピペッティング 10 回により泡立たないように混合します。
4. 反応プレートを 37°C で 10 分間、または室温で 30 分間反応します。
5. Binding Buffer のボトルを 20 回以上攪拌し、ビーズを完全に再懸濁します。Binding Buffer 300 μ L (200 μ L の場合; サンプルの 1.5 倍容) を加え、ピペッティング 10 回により混合します。
磁性ビーズと DNA を結合するステップです。ピペッティングは泡立たないようにゆっくりと行ってください。気泡は磁性ビーズと DNA の結合を阻害し、収量を低下させます。
6. 反応プレートを室温で 5 分間静置し、DNA をビーズに結合します。
7. 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。

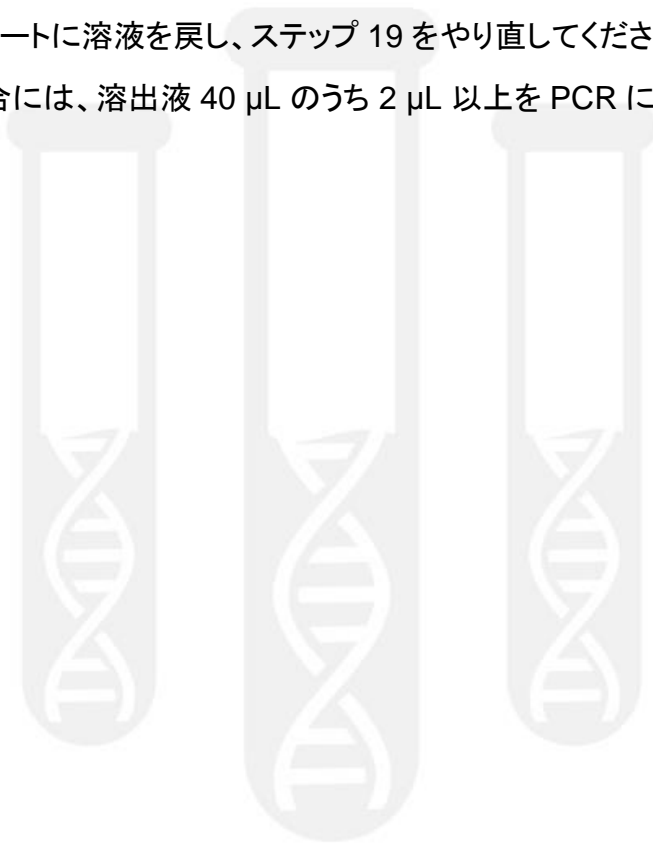
8. 反応プレートが磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
磁性ビーズが見えづらい場合には、ウェル底の中心部にチップを差し入れて、リング状の磁性ビーズを乱さないように上清を除去します
9. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、Wash 1 800 μ L (200 μ L の場合; サンプルの 4 倍容) を加えます。ピペッティング 10 回により磁性ビーズを十分に再懸濁します。
10. 反応プレートを磁気プレート上で 10 分間または上清が透明になるまで静置し、溶液中のビーズを分離します。
11. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
12. ステップ 9~11 の Wash 1 洗浄を再度繰り返してください。
13. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、Wash 2 溶液 500 μ L (200 μ L の場合; サンプルの 2.5 倍容) を加えます。ピペッティング 10 回により磁性ビーズを十分に再懸濁します。
14. 反応プレートを磁気プレート上で 6 分間静置し、溶液中のビーズを分離します。
15. 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。
16. ステップ 13~16 の Wash 2 溶液洗浄を再度繰り返してください。
17. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、プレートの底や壁についた水滴をピペットで吸い取るなどして、Wash 2 溶液を可能な限り除去します (必要に応じて 5 分間風乾します)。全血サンプルの場合は溶出液 200 μ L、血清サンプルの場合は溶出液 40 μ L を入れます。
高濃度の DNA を得たい場合には、溶出液量を少なくすることが可能です。洗浄後の磁性ビーズを過度に乾燥すると、DNA が溶出しづらくなる場合があります。

18. 反応プレートが磁気プレートから下ろし、ピペティングにより磁性ビーズを十分に再懸濁し、室温で2分間静置します。完全にDNAを溶出するため、ピペティングにより磁性ビーズを再度懸濁します。

19. 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。溶出DNAを含む上清を、新しい保存用プレートまたはチューブに移します。

全血サンプルの場合は、溶出液25 μL を元の反応プレートに残すようにします。血清サンプルの場合は、溶出液を元の反応プレートに残す必要はありません。磁性ビーズが混入した場合には、元の反応プレートに溶液を戻し、ステップ19をやり直してください。

血清サンプルの場合には、溶出液40 μL のうち2 μL 以上をPCRに使用すると、良好な結果が得られます。



全血/血清 400 μ L 以下、2 mL チューブでの実験手順

凍結または非凍結の、凝固剤入り全血または血清の血液サンプルに対応します。凍結サンプルは、室温または 37°C で解凍し、十分に転倒混和します。

全血/血清 400 μ L をサンプルとする場合には、2 mL チューブを使用してください。1.7 mL チューブを使用する場合には、サンプル量を 300 μ L にしてください。

1. 96 μ g/ μ l Proteinase K 溶液と Wash 2 を調製します。

Proteinase K のボトルに、PK Buffer を 50 preps、384 preps いずれの場合も 1 mL 加え、混合します。調製後の溶液は、-20°C で保存します。

Wash 2 のボトルに、100% エタノールを 50 preps の場合は 105 mL、384 preps の場合は 375 mL 加え、混合します。調製後の溶液は、室温で保存します。

2. 血液サンプルを数回転倒混和します。ピペッティングやボルテックスで攪拌は推奨しません。400 μ L 以下の血液サンプルを 2 mL マイクロチューブに入れます。

3. Lysis Buffer 800 μ L (400 μ L の場合; サンプルの 2 倍容) と Proteinase K (96 μ g/ μ l) 溶液 18 μ L (400 μ L の場合; サンプルの 0.045 倍容) とを加え、ピペッティング 10 回により泡立たないように混合します。

4. チューブを 37°C で 10 分間、または室温で 30 分間反応します。

5. Binding Buffer のボトルを 20 回以上攪拌し、ビーズを完全に再懸濁します。Binding Buffer 600 μ L (400 μ L の場合; サンプルの 1.5 倍容) を加え、ピペッティング 10 回によりに混合します。

磁性ビーズと DNA を結合するステップです。ピペッティングは泡立たないようにゆっくりと行ってください。気泡は磁性ビーズと DNA の結合を阻害し、収量を低下させます。

6. チューブを室温で 5 分間静置し、DNA をビーズに結合します。

7. チューブを磁気スタンド上で 15 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。

8. 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。
磁性ビーズが見えづらい場合には、磁性ビーズと反対側にチップを差し入れて、上清を慎重に除去します。
9. チューブを磁気スタンドから下ろし、Wash 1 1.6 mL (400 μ L の場合; サンプルの 4 倍容) を加えます。ピペッティング 10 回により磁性ビーズを十分に再懸濁します。
10. 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、溶液中のビーズを分離します。
11. 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。
12. ステップ 9~11 の Wash 1 洗浄を再度繰り返してください。
13. チューブを磁気スタンドから下ろし、Wash 2 溶液 1 mL (400 μ L の場合; サンプルの 2.5 倍容) を加えます。ピペッティング 10 回により磁性ビーズを十分に再懸濁します。
14. チューブを磁気スタンド上で 6 分間静置し、溶液中のビーズを分離します。
15. 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。
16. ステップ 13~16 の Wash 2 溶液洗浄を再度繰り返してください。
17. チューブを磁気スタンド上に置いたままで、チューブの底や壁についた水滴をピペットで吸い取るなどして、Wash 2 溶液を可能な限り除去します (必要に応じて 5 分間風乾します)。全血サンプルの場合は溶出液 400 μ L、血清サンプルの場合は溶出液 40 μ L を入れます。
高濃度の DNA を得たい場合には、溶出液量を少なくすることが可能です。洗浄後の磁性ビーズを過度に乾燥すると、DNA が溶出しづらくなる場合があります。

18. チューブを磁気スタンドから下ろし、ピペティングにより磁性ビーズを十分に再懸濁し、室温で 2 分間静置します。完全に DNA を溶出するため、ピペティングにより磁性ビーズを再度懸濁します。

19. チューブを磁気スタンド上で 5 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。溶出 DNA を含む上清を、新しい保存用プレートまたはチューブに移します。

磁性ビーズが混入した場合には、元のチューブに溶液を戻し、ステップ 19 をやり直してください。

血清の場合には、溶出液 40 μ L のうち 2 μ L 以上を PCR に使用すると、良好な結果が得られます。



07-QMJ-161011

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>

