

試薬の調製

事前調製

- Wash Solution (3ml/30ml) に 95-100%エタノール(12ml/120ml)を加えます。→室温で保存します。
- Lysis Buffer (LBA) (1 ml/30ml) に Blue Dye (10 μ l/100 μ l) を加え、ボルテックスします。
→室温で保存します。

その他準備するもの

- 95-100% エタノール
- 80℃ ヒートブロック
- 56℃ ヒートブロック
- 1.5ml 遠心チューブ / 遠心機 (室温で遠心します)

プロトコール (キシレンを使わない方法)

脱パラフィン/サンプル溶解

- ① パラフィン切片(10-100 μ m 分)を遠心チューブに移して、ミネラルオイルを加えます
 - 切片の合計:50 μ m以下の場合には、300 μ lのミネラルオイルを加えます。
 - 切片の合計:50 μ m以上の場合には、500 μ lのミネラルオイルを加えます。
- ② 80℃ 1 分間インキュベートしたのち、ボルテックスします。
- ③ 200 μ l のLysis Bufferを加えます。
- ④ 10,000 $\times g$, 15秒間 遠心します。
- ⑤ 二層に分離した下層 (水層) に20 μ lのProteinase Kを加えて、ピペティングして混ぜます。
- ⑥ 56℃ 1 時間→80℃ 4 時間 インキュベート後室温に戻し、蓋についた液などを回収するために軽く遠心します。

RNase 処理

- ⑦ 下層に RNase A 溶液を 10 μ l 加えて、ピペットで混ぜます。
- ⑧ 室温 (20-25℃) で 5 分間インキュベートします。

DNA 結合

- ⑨ 220 μ l の BL Buffer をサンプルに加えます。
- ⑩ 240 μ lのエタノール (95-100%) を加えて ボルテックスします。
- ⑪ 10,000 $\times g$, 15 秒間 遠心します。上層 (油層) と下層 (水槽) に分かれます。
- ⑫ ReliaPrep™ FFPE Binding Column (カラム) を Collection Tube にセットします。
- ⑬ 下層 (水層) をカラムに移して、10,000 $\times g$, 30 秒間 遠心します。
(少量の上層 (油層) の持ち込みは、精製に影響しません)
- ⑭ Collection Tube に貯まったフロースルーを捨て、カラムを再度 Collection Tube にセットします。

カラム洗浄

- ⑮ 500 μ l の Wash Solution をカラムに加えて、10,000 $\times g$, 30 秒間 遠心します。
- ⑯ フロースルーを捨て、再度 500 μ l の Wash Solution をカラムに加えて、10,000 $\times g$, 30 秒間 遠心します。
- ⑰ フロースルーを捨て、カラムの蓋を開けて 16,000 $\times g$, 3 分間 遠心して、カラムを乾燥させます。

DNA 溶出

- ⑱ カラムを新しい 1.5ml の遠心チューブに移し替え、30-50 μ l の Elution Buffer を加えます。
- ⑲ 16,000 $\times g$, 1分間 遠心して、DNAを溶出します。
- ⑳ 溶出したDNAは、-20℃で保管します。

参考：キシレンを使って脱パラフィン後に精製する方法もあります。プロトコールは、英文マニュアルをご覧ください。

