

Maxwell[®] RSC Genomic DNA Kit (カタログ番号 AS1880) 簡易マニュアル

ご用意いただくもの

- ボルテックスミキサー
- ピペットマン (P-20、P-200、P-1000)とそれらのチップ
- 1.5~2.0ml遠心チューブ
- 56℃に設定したヒートブロック、ウォーターバス、またはサーマルミキサー
- Nuclease-Free Water 細胞ペレット、組織用
- 1×Phosphate Buffered Saline (PBS) 細胞洗浄用

組織からのDNA抽出

サンプル量 : 5~50mg

1. サンプルをチューブに入れる。
2. **300μl Nuclease-Free Water**を加える。
3. **30μl Proteinase K Solution**を加える。
4. 10秒間のボルテックスにより十分に攪拌する。
5. **300μl Lytic Enhancer (LE2)**を加える。
6. 10秒間のボルテックスにより十分に攪拌する。
7. 以下のいずれかの方法で、サンプル/試薬を加えたチューブを56℃でインキュベートする。
 - a) サーマルミキサー使用時：高速（例:1,500rpm）で振とうしながら、最長2時間までインキュベートする。
 - b) ヒートブロックまたはウォーターバス使用時：振とうせずに、少なくとも16時間インキュベートする。
※16時間は組織を十分に溶解させるための目安です。適切なインキュベート時間は、組織の種類・大きさに依りますので、ご使用のサンプルで事前にご確認頂くことをお勧めします。
8. 10秒間のボルテックスにより十分に攪拌する。
9. 遠心（15,000g×5分）
10. 上清を新しいチューブへ移す。
11. **300μl Lysis buffer**を加える。
12. 10秒間のボルテックスにより十分に攪拌する。

細胞からのDNA抽出

サンプル量：尿：15～50ml、羊水：1～5ml、末梢血単核細胞 (PBMC)： $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ cells、培養細胞： $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^6$ cells

細胞ペレットの用意

1. サンプル ($5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^6$ cells) を遠心 (2,000g×20分) し、上清を除去する。
2. 1×PBSを加え、懸濁させたのち、遠心 (2,000g×20分) し、上清を除去する。
(尿の場合は、750μl 1×PBSを懸濁したのち、遠心する。)

ライセートの調製

1. 300μl Nuclease-Free Waterを細胞ペレットが入ったチューブに加え、懸濁する。
2. 30μl Proteinase K Solutionを加える。
3. 10秒間のボルテックスにより十分に攪拌する。
4. 300μl Lytic Enhancer (LE2)を加える。
5. 300μl Lysis bufferを加える。
6. 10秒間のボルテックスにより十分に攪拌し、均一な状態になっていることを確認する。
7. 56℃に設定したヒートブロックに、サンプル/試薬を加えたチューブをセットし、20分 処理する。
8. 10秒間のボルテックスにより十分に攪拌する。

全血/Buffy coatからのDNA抽出

サンプル量：全血、Buffy coat: 50～300μl

(白血球数が、 $4 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ cells/ml血液のサンプルの場合)

* Buffy coatの場合は、溶出Bufferを200μlで実施することを推奨します。

サンプルの用意

サンプルは、15～30℃5分間、十分にロータリー、シェーカーなどで攪拌し、均一な状態にしておく。

ライセートの調製

1. 30μl Proteinase K Solutionをチューブに加える。
2. サンプルを加える。
* 凝固した血液・脂肪分が含まれないようにする。
3. 10秒間のボルテックスにより十分に攪拌する。
4. 300μl Lytic Enhancer (LE2)を加える。
5. 300μl Lysis bufferを加える。
6. 10秒間のボルテックスにより十分に攪拌し、均一な状態になっていることを確認する。
7. 56℃に設定したヒートブロックに、サンプル/試薬を加えたチューブをセットし、20分 処理する。
8. 10秒間のボルテックスにより十分に攪拌する。

骨髓細胞 (Bone Marrow Aspirate) からのDNA抽出

サンプル量 : 50~300 μ l

* Buffy coatの場合は、溶出Bufferを200 μ lで実施することを推奨します。

サンプルの用意

サンプルは、15~30℃ 30分間、十分にロータリー、シェーカーなどで攪拌し、
均一な状態にしておく。

ライセートの調製

1. **30 μ l Proteinase K Solution**をチューブに加える。
2. サンプルを加える。
* 凝固したものが含まれないようにする。
3. 10秒間のボルテックスにより十分に攪拌する。
4. **300 μ l Lytic Enhancer (LE2)**を加える。
5. **300 μ l Lysis buffer**を加える。
6. 10秒間のボルテックスにより十分に攪拌し、均一な状態になっていることを確認する。
7. 56℃に設定したヒートブロックに、サンプル/試薬を加えたチューブをセットし、
20分 処理する。
8. 10秒間のボルテックスにより十分に攪拌する。

スワブからのDNA抽出

サンプル量 : 1~2 Swabs

Lytic Enhancer / Proteinase K溶液の調製

1サンプルあたり、**300 μ l Lytic Enhancer (LE2)**と**30 μ l Proteinase K Solution**を混ぜた
のち、10秒間ボルテックスし、よく混合しておく。

ライセートの調製

1. 1~2本のスワブの先端を入れる。
2. **330 μ l Lytic Enhancer/Proteinase K溶液**を加える。
3. 56℃に設定したヒートブロックに、サンプル/試薬を加えたチューブをセットし、
20分 処理する。
4. **300 μ l Lysis buffer**を加える。
5. 10秒間のボルテックスにより十分に攪拌し、均一な状態になっていることを確認する。

カートリッジの準備

1. 検体数分のカートリッジをMaxwell® RSC/CSC Deck Trayに立て、順にアルミシールを剥がす。
カートリッジの両端がカチッというまで、しっかりとセットする
注意：サンプル数が16より少ない場合には、Maxwell® RSC/CSC Deck Trayの中央部分をお使いください。
2. 同数のElution Tubeをセットし、50～200μlのElution Bufferを加える。
サンプル量に合わせて、適切な溶出液を設定してください。
Elution Tubeのフタは絶対に閉めないでください。
3. カートリッジのウェル8に、プランジャーを置く。
4. サンプル全量を、カートリッジのウェル1に添加し、
5～10回、ピペティングにより攪拌する。
ウェル1は最も大きなウェルです。カートリッジラベルに一番近く、Elution tubeからは最も遠い位置にあります。
*脂肪分や組織残渣などの固形物が混入しないように、遠心後の上清（水層）のみを加える。
5. 15μlのRNase Solutionをウェル3に添加する。
6. Maxwell RSC Instrumentを起動し、Startから『Genomic DNA /AS1880』を選択する。
7. Maxwell® RSC/CSC Deck Trayを、Maxwell® RSC本体にセットし、精製操作をスタートする。



精製終了後の操作

1. Maxwell RSC® Instrumentのドアを開け、Elution Tubeのフタを閉める。
2. Maxwell® RSC/CSC Deck Trayを取り出し、Elution Tubeを適切に保管する。
3. Maxwell RSC® Instrumentのドアを閉める。カートリッジとプランジャーを廃棄する。