

循環セルフリーDNA分離 クイックガイド

cfDNAキット × 血漿3 mL, 4 mL, 5 mL プロトコール編

QuickGene cfDNA Isolation Kit (CF-L)



このシートは、CF-Lキットの血漿から循環セルフリーDNAを分離する手順をカスタマイズしたものです。安全情報や注意事項などはキットハンドブック・取扱説明書をよく読み、正しくご使用ください。



適切な保護手袋、および保護めがねを着用して作業を行ってください。

step1 準備

目的のcfDNA分離を行うために、下記のものをご準備ください。

1 準備

QuickGene-Mini8L

QuickGene cfDNA Isolation Kit (CF-L)



特級エタノール (>99%)

1.5 ml マイクロチューブ (DNA 回収用)

50 ml 遠沈管 (前処理用)

マイクロピペット (P-1000)

ウォーターバス (56°C)

手袋

保護めがね

10 ml ピペット または 電動ピペッター



チューブミキサー



2 試薬の準備

◆前処理酵素 (ECF)

凍結乾燥品を含む瓶に3.3 mlのヌクレアーゼフリーの水を添加し、時々攪拌しながら室温に30分以上置き、完全に溶解させてください。

(溶解後は4°Cで2ヶ月間保存できます。それ以上長期間保存される場合は小分けにして-80°Cで保存してください。)

◆溶解液 (LCF)

使用前に十分に混和してください。析出物が生じた場合は、37°Cで溶解してください。

◆洗浄液 (WCF)

ご使用前のWCFボトルに特級エタノール (>99%) を160 ml添加・混合してください。

エタノール添加後は、フタをきちんと閉めて室温で保存してください。

◆回収液 (CCF)

核酸溶出時には、必ずCCFを使用してください。

続いて対応するプロトコールを行います。

Step2 プロトコール

目的の収量を得るため、必ず下記の手順で作業を行ってください。

1 ウォーターバスを56°Cに設定します。

2 QuickGene-Mini8Lに消耗品をセットします。

消耗品のセットに関してはQuickGene-Mini8Lの取り扱い説明書をご参照ください。

3 ライセートの作製 * 血漿3 ml (③), 血漿4 ml (④), 血漿5 ml (⑤)

- 1) 溶解済みの前処理酵素 (ECF) ③0.45 ml、④0.60 ml、⑤0.75 mlを50 ml 遠沈管の底に分注します。
- 2) 血漿③3 ml、④4 ml、⑤5 mlを添加します。血漿添加後、直ちに3)を行います。

以下 3) 4) は1サンプルずつ連続して行ってください。

- 3) 溶解液 (LCF) ③3.75 ml、④5.00 ml、⑤6.25 mlを添加し、直ちに上下に激しく振とう混和10回を行います。

振とう混和を確実にし、ECF、全血、LCFが十分に混合するようにします。
次の作業でボルテックスを行います。もし、お持ちのボルテックスの最大回転数が2,500 rpm以下の場合は、
念入りに振とう混和を行ってください。

- 4) 30秒間最大回転数 (2,500 rpm以上推奨)でボルテックスを行います。

混合が不十分な場合、DNA収量の低下やカートリッジ(CA)の目詰まりが起こる場合があります。

- 5) 56°Cに設定したウォーターバスで5分間インキュベートします。

インキュベート後、2分経過時にチューブを3回反転混合してください。その後、インキュベートを継続してください。
以下 6) 7) は1サンプルずつ連続して行ってください。

- 6) 特級エタノール (>99%) を③1.8 ml、④2.4 ml、⑤3.0 ml添加し、直ちに上下に激しく振とう混和10回を行います。
- 7) 30秒間最大回転数 (2,500 rpm以上推奨)でボルテックスを行います。

混合が不十分な場合、DNA収量の低下やカートリッジ (CA)の目詰まりが起こる場合があります。

4 ライセート完成

ライセート完成後、30分以内に分離を行ってください。

続いてstep3 分離を行います。

Step3 分離

QuickGene-Mini8Lを使って、目的のDNAを分離します。

QuickGene-Mini8L分離フロー

分離フロー中の加圧マーク  は下記操作を意味しています。

- ① 消耗品をセットしたホルダをQuickGene-Mini8Lにセットし、カートリッジの1列目が加圧ノズルの真下にくる位置まで押し込む。 ※ホルダセットの手順は装置の取扱説明書をご参照ください。
- ② 加圧スイッチをONの位置に回して加圧する。
- ③ カートリッジ内に液が残っていないことを確認してから加圧スイッチをOFFの位置に戻す。
- ④ ホルダをスライドさせ、カートリッジの2列目を加圧ノズルの真下に置き、②と③の手順を行う。
- ⑤ ホルダを装置から取り出す。

