マニュアル

sbeadex Lightning DNA精製キット

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

PRIMETECH CORPORATION

BIOSEARCH™ TECHNOLOGIES

GENOMIC ANALYSIS BY LGC

マニュアル

sbeadex Lightning DNA精製キット

目次

1. 本マニュアルについて....3
2. sbeadexLightningケミストリーについて....3
3. キットの構成と保管条件....4
4. 実験手順....5
   4.1 開始前の一般的な情報....5
   4.2 溶解の推奨事項....6
      4.2.1 植物....6
      4.2.2 家畜....6
   4.3 インプット容量の最適化....6
      4.3.1 植物サンプル....6
      4.3.2 家畜サンプル....7
   4.4 磁石と代替方法....7
   4.5 sbeadex particlesの再懸濁....7
   4.6 Lysis bufferの沈殿....7
   4.7 Binding bufferおよび沈殿の着色....7
   4.8 ラボの条件....7
   4.9 キットの他に必要なもの....8
   4.10 植物サンプルの破砕....8
5. 自動化....9
6. プロトコル....10
7. トラブルシューティング....12
8. FAQ....12
9. サポート....12

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

マニュアル

sbeadex Lightning DNA精製キット

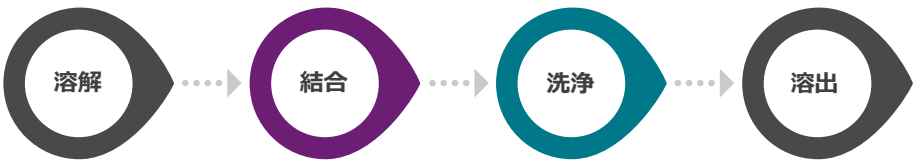
1. 本マニュアルについて

本マニュアルには、sbeadex™ Lightning 核酸精製ケミストリーの一般的な紹介と、ラボでの sbeadex Lightning DNA精製キットの実施方法に関する詳細が示されています。このマニュアルには、さまざまな種類のサンプルからDNA精製を行うために必要なラボプロトコルへのリンク、およびプロトコルの自動化に関する情報とガイダンスも含まれています。

2. sbeadex Lightningケミストリーについて

sbeadex Lightningケミストリーは、超常磁性ビーズと新しい1ステップ結合メカニズムを用いて核酸を結合・精製します。1回の水洗浄ステップと組み合わせたこのユニークなプロセスで、不純物や酵素反応の潜在的阻害物質を非常に効果的に除去します。この革新的な技術により、sbeadex Lightningは、粗抽出法のスピードで、高品質で自動化可能な精製を提供します。

sbeadexケミストリーにより高収量・高純度・高品質なDNAが得られ、PCR、qPCR、シーケンシング、NGS、制限酵素解析等多くの下流アプリケーションに適します。



sbeadex Lightning DNA精製キットはモジュラーシステムとして提供されます。2種類のコアキット（AおよびB、表1参照）があり、それぞれに異なるBinding buffer、sbeadex particlesおよびElution bufferが含まれています。LGC Biosearch Technologies社では、コアキットに加え、サンプルタイプに応じたプロトコルに対応するため、個別のLysis bufferと添加剤を各種取り揃えています。個々のコンポーネントは、お客様にオーダーメイドのソリューションを提供するために、別々に購入することができます。

sbeadex Lightning DNA精製キット スターターキットは、特定のサンプルタイプに対するサンプル溶解条件の最適化を容易にします。このキットは、両コアキットのBinding buffer、Elution buffer、sbeadex particles、6種類のLysis buffer、Protease K solution、Debris capture beadsで構成されています。

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

sbeadex Lightning キット	説明
sbeadex Lightning DNA精製キット コアキット A	多くのサンプルタイプに適します。ほとんどの植物サンプルに推奨されます。
sbeadex Lightning DNA精製キット コアキット B	特定のサンプルタイプ、特に哺乳類組織サンプルに適します。
sbeadex Lightning DNA精製キット スターターキット	あらゆる種類のサンプルに適しており、コアキットおよびLysis bufferの種類また添加剤の最適な組成を決定するために推奨されます。

表 1. sbeadex Lightning コアキットとスターターキットの詳細。特定のサンプルタイプに適するキット構成の詳細についてはウェブサイトをご覧ください。

Biosearch Technologiesでは、パイロット試験や、必要に応じてカスタマイズされたソリューションを提供しています。

3. キットの構成と保管条件

	コアキット A			コアキット B			
内容	NAP40-030-01	NAP40-030-02	NAP40-030-03	NAP40-031-01	NAP40-031-02	NAP40-031-03	保管条件
Binding buffer LP	22 mL	220 mL	2200 mL	-	-	-	室温
Binding buffer LU	-	-	-	22 mL	220 mL	2200 mL	室温
sbeadex particle suspension	2.2 mL	22 mL	220 mL	2.2 mL	22	220 mL	室温
Elution buffer AMP	11 mL	110 mL	1100 mL	11 mL	110	1100 mL	室温

表 2. sbeadex Lightning コアキットに含まれる内容

内容	容量 (mL)	保管条件
Binding buffer LP	2 mL	室温
Binding buffer LU	2 mL	室温
sbeadex particle suspension	0.4 mL	室温
Elution buffer AMP	2 mL	室温
Lysis buffer PN	4 mL	室温
Lysis buffer PVP	4 mL	室温
Lysis buffer UR	4 mL	室温
Lysis buffer BL	4 mL	室温
Lysis buffer H	4 mL	室温
Lysis buffer LI	4 mL	室温
Protease K solution	200 µL	室温
Debris capture beads	160 µL	室温

表 3. sbeadex Lightning スターターキットに含まれる内容

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

	型式	容量	保管条件
Lysis buffer PN	NAP10-006-00/...-01/...-02/...-03/...-04/...- 05	30-3,000 mL	室温
Lysis buffer PVP	NAP10-010-00/...-01/...-02/...-03/...-04/...- 05	30-3,000 mL	室温
Lysis buffer UR	NAP10-004-00/...-01/...-02/...-03/...-04/...- 05	30-3,000 mL	室温
Lysis buffer BL	NAP10-002-00/...-01/...-02/...-03/...-04/...- 05	30-3,000 mL	室温
Lysis buffer H	NAP10-003-00/...-01/...-02/...-03/...-04/...- 05	30-3,000 mL	室温
Lysis buffer LI	NAP10-005-00/...-01/...-02/...-03/...-04/...- 05	30-3,000 mL	室温
Protease K solution	NAP30-002-01/...-02/...-03/...-04/...- 05/...-06	1-1,000 mL	室温
RNase A solution	NAP30-003-01/...-02/...-03	1-100 mL	4 °C
Debris capture beads	NAP20-005-00/...-01/...-02/...-03/...-04/...- 05	1-1,000 mL	室温

表 4. sbeadex Lightning に使用するLysis bufferと添加剤（別購入となります）

4. 実験手順

4.1 開始前の一般的な情報

sbeadex Lightningケミストリーで最適な結果を得るには、Lysis bufferを最適化することで、最終DNA溶出液の収量と純度を高めることができます。以下に挙げるLysis bufferは、サンプルの特性に応じて、より最適な溶解を可能にするさまざまな化学的特性を有しています。表5は、各サンプルタイプにどのLysis bufferを使用すべきかを示しています。

Lysis buffer PN	CTABベースのバッファー – 植物サンプルに一般的な溶解バッファー
Lysis buffer PVP	CTABベースのバッファー – ポリフェノールが豊富な植物サンプルや、毛髪など色素の多いサンプルに
Lysis buffer BL	SDSベースの溶解バッファー
Lysis buffer H	厳しいSDSベースの溶解バッファー
Lysis buffer UR	CTABベースの溶解バッファー – プロテアーゼとの併用でタンパク質を強力に変性させる
Lysis buffer LI	SDSベースのバッファー– 種子や幼葉、組織などに最適

表 5. sbeadex Lightning DNA精製ケミストリーに使用できるBiosearch Technologies社製の各種溶解バッファーと、サンプルタイプに対する適合性に関するガイダンス。sbeadex Lightningは、他の溶解バッファーにも対応しています。これらは、sbeadex Lightningコアキットと一緒にお試しいただけます。サポートが必要な場合ご連絡ください。

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

4.2 溶解の推奨事項

どのLysis　bufferを使用するか、また溶解反応の長さは、サンプルタイプと下流アプリケーションのニーズによって異なります。適切なLysis bufferは、表5の情報に基づいて経験的に決定する必要があります。特定のサンプルタイプに対する推奨構成につきましては、ウェブサイトをご覧ください。

4.2.1 植物

一般に、植物サンプルは10～60分間溶解してください。植物サンプルの場合、プロテアーゼ処理を強く推奨します。この場合、1 mL のLysis bufferあたり 2 µL の Protease K solution（20 mg/mL）を使用してください。Lysis bufferとProtease K溶液のプレミックスは、1日間安定です。残渣の多い植物サンプルの場合は、Lysis buffer 1mLあたり40µLのDebris capture beads加えると残渣を捕捉できます。RNase消化が必要な場合は、溶解中にLysis buffer 1mLあたり約1 µLのRNase（20 mg/mL）を加えます。Protease K処理を行う場合は、最初に RNase、次に Protease K 溶液で順次処理することを推奨します。あるいは、RNase処理は水洗浄ステップ中に行うこともできます。サンプルの溶解後、最大速度で遠心分離を行い、残渣をペレット化してください。サンプルの種類によって異なりますが、2500 x gで10分間を推奨します。遠心分離後、上清を移し、精製プロトコルに使用してください。

4.2.2 家畜

家畜サンプルは、100 µL の溶解反応あたり 10 µL の Protease K 溶液（20 mg/mL）を用いたオーバーナイトでの溶解が有効です。Lysis bufferとProtease K溶液のプレミックスは、一日間安定です。RNA消化が必要な場合は、溶解中にLysis buffer 1 mLあたり約1µLのRNase A（20 mg/mL）を加えるてください。Protease K処理を行う場合は、最初にRNase、次にProtease K溶液で順次処理することを推奨します。あるいは、RNase処理は水洗浄ステップ中に行うこともできます。溶解後に残渣（毛髪など）が残っている場合は、サンプルを最大速度で遠心分離して残渣をペレット化し、上清を移して精製プロトコルに使用してください。

4.3 インプット容量の最適化

4.3.1 植物サンプル

適切な溶解液量を確実に使用するために、表6に示された推奨値を考慮してください。サンプルの種類や処理によって、試料の挙動が大きく異なることがあるため、必要な容量は異なる場合があります。
'上清'の行には、表示された量のLysis bufferで異なるサンプルタイプ・量を溶解した後、結合に使用できる予想液量が記載されています。

	葉パンチ 3 mm		葉パンチ 6 mm		破砕種子（乾燥）		破砕葉（乾燥）	
サンプル	新鮮	乾燥	新鮮	乾燥	新鮮	乾燥	新鮮	乾燥
Lysis buffer [µL]	250	250	300	300	300	300	400	600
上清 [µL]	200	200	200	200	200	200	200	200

表 6. 異なるサンプルタイプと量を用いた溶解から得られる上清の予想量。植物によって値が異なる場合がありますのでご注意ください。

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

4.3.2 家畜サンプル

家畜組織サンプルの場合、組織をLysis bufferに完全に浸してください。溶解バッファーの量は、組織の種類と核酸含有量に応じて最適化します。

4.4 磁石と代替方法

sbeadexキットのプロトコルを実施する際には、磁性粒子をペレット化するために磁石または遠心分離機が必要です。磁石の使用を推奨しますが、磁石を使用せずに手動でプロトコルを実施する場合は、サンプルチューブを可能な限り高速で10秒間遠心して、磁性粒子をペレット化することができます。

4.5 sbeadex particlesの再懸濁

sbeadex particle suspensionをBinding bufferに添加する前に、適切に再懸濁することが重要です。均一でないsbeadex particle suspensionを使用すると、精製効率に影響し、DNA収量が低下したり、結果が均一でなくなる可能性があります。

4.6 Lysis bufferの沈殿

Lysis bufferの中には、低温で塩の沈殿が生じるものがあります。使用前に必ず沈殿の有無を確認してください。沈殿が生じた場合は、バッファー を55℃で30分間インキュベートし、十分に振盪して沈殿を再溶解させてください。

4.7 Binding bufferおよび沈殿の着色

特にBinding buffer LPにおいて、またBinding buffer LUにおいても、時間の経過とともに着色を生じることがありますが、これは正常であり、性能には影響しません。Binding bufferもまた、温か過ぎる条件で保存すると沈殿が生じることがありますが、溶液を振盪し、8 °C に冷却することで、元に戻すことができます。沈殿の量が少なくても、性能に影響はありません。使用前にBinding bufferを振盪することを推奨します。

4.8 ラボの条件

すべての工程は特に記載のない限り室温(15-25 °C)で行ってください。

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

4.9 キットの他に必要なもの

以下のリストは、sbeadex Lightning コアキットに含まれる試薬に加えて、ラボで sbeadex Lightning DNA精製を実施するために必要な装置および試薬の詳細です。

必須

- 磁石スタンドあるいは遠心分離機
- 96-あるいは384-wellプレート、あるいはチューブ
- 遠心分離機（植物サンプル）
- ウォーターバスあるいはインキュベーター（55 °Cまで使用できるもの）
- 脱塩水あるいは超純水（pH 7以下）

推奨

- Protease K solution (20 mg/mL)
- Debris capture beads （植物サンプル）

オプション

- RNase A (20 mg/mL)
- Beta-Mercaptoethanol
- 1-Thioglycerol
- Tween 20

4.10 植物サンプルの破砕

sbeadex Lightning DNA精製プロトコルを実施する前に、各植物サンプルを破砕する必要があります。高分子量のDNAを得るためには、破砕前に植物サンプルを凍結乾燥することを推奨します。凍結乾燥した植物サンプルは、溶解液を加えずに破砕してください。新鮮植物サンプルを使用する場合（凍結乾燥しない場合）は、破砕前に液体窒素中で凍結させるか、250 µLのLysis buffer中で破砕します。処理するサンプル数が少ない場合、植物サンプルは以下のいずれかの方法で破砕することができます：

- モーターとペッスルを用いて破砕します。海砂を加えると組織の破砕に有効です。
- 1.5 mLマイクロ遠心チューブ中でマイクロペッスルを用いて破砕します。
- 1.5 mL/2 mLサンプルチューブ中で金属ボールとボールミルを用いて破砕します。

処理するサンプル数が多い場合、植物サンプルは以下のいずれかの方法で破砕することができます：

- サンプルチューブラック（例、1.4 mLチューブの96アレイ）と金属ボールを用いてボーミルで破砕します。
- シールされた96-wellプレートと金属ボールを用いてボールミルで破砕します。

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

5. 自動化

5.1 KingFisher Flexシステムを用いた自動化

LGC Biosearch TechnologiesはKingFisher Flexシステム (ThermoFisher Scientific)を用いたsbeadex Lightning DNA精製プロトコルを自動化するための KingFisher™ BindIt ファイルを提供しています。詳しくはウェブサイトをご覧ください。プロトコルの調整が必要な場合、次のガイドラインに留意してください：

1. すべての容量は手動でのプロトコルと同じにしてください。加熱しての溶出時間が長くなると、蒸発が起こる可能性があります（例、10分間の溶出を行う場合、Elution bufferを20 µL追加することを推奨します）。

2. 拡散に依存する洗浄効果を考慮し、結合と洗浄ステップでのインキュベーション時間は最低1分間としてください。70℃、1-10分間溶出を行ってください。

3. 洗浄と溶出ステップの混合の前に、‘bottom mix’ で10秒間‘Release Beads’機能を使用してください。 自動混合は'Fast'設定で行ってください。

5.2 oKtopureを用いた自動化

sbeadex Lightning DNA精製プロトコルは、oKtopure™全自動DNA抽出ロボットで自動化することができます。詳しくはウェブサイトをご覧ください。oKtopureについてのお問い合わせ、またはパイロット試験についてのご相談は下記までご連絡ください。
reagents@primetech.co.jp

6.プロトコル

この sbeadex Lightning プロトコルは、様々な種の植物および家畜組織からの DNA 単離に適しており、新鮮組織および凍結乾燥組織の両方からの精製に最適化されています。植物サンプルの場合、典型的な開始サンプル量は、1回の精製につき凍結乾燥組織で10～30 mg、または新鮮組織で40～120 mgです。家畜の場合、出発物質の量はサンプルの種類によって異なります。

6.1 手動でのプロトコル

精製プロトコルを開始する前に、本マニュアルのセクション4.2および4.10に詳述されているように、組織サンプルが適切にホモジナイズ、溶解および遠心分離され、セクション4.1に記載されている一般情報が考慮されていることを確認してください。

1. ライセートに等量のBinding buffer LPあるいはLUを加えます（例、200 µLライセート＋ 200 µL Binding buffer）。ここにBinding buffer 100 µLに対して10 µLのsbeadex particle suspensionを加えます（例、200 µLのBinding bufferを使用する場合、20 µLのsbeadex particlesを加えます）。Binding bufferとsbeadex particlesのプレミックスを使用する場合、プロトコル実施直前に調製してください。
   注意：使用前にsbeadex particle suspensionがよく混合されていることを確認してください。
2. 30秒間ボルテックスした後、室温で30秒間静置します。
3. チューブを磁石スタンドにセットし、sbeadex particlesをペレット化させます（サンプルタイプによりますが、通常15-60秒かかります）。ステップ4に進む前に、すべてのsbeadex particlesがペレット化していることを確認してください。
4. 上清を除去し、廃棄します。上清をできるだけ取り除き、ペレットが外れないように注意してください。
5. チューブを磁石スタンドから外します。
6. 適切な量の水を加え、30秒間ボルテックスした後、室温で30秒間静置します。水の量は、ステップ1のライセート量の2倍量としてください（例、200 µLのライセートを使用した場合、400 µLを加えてください）。
7. チューブを磁石スタンドにセットし、sbeadex particlesをペレット化させます（サンプルタイプによりますが、通常15-60秒かかります）。ステップ8に進む前に、すべてのsbeadex particlesがペレット化していることを確認してください。
8. 上清を除去し、廃棄します。上清をできるだけ取り除き、ペレットが外れないように注意してください。

（次ページへ続く）

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

9．適切な量のElution buffer AMPを加え、60秒間ボルテックスします。あるいは、30秒間ボルテックスした後、60℃で1-5分間インキュベートします。Elution buffer AMPの量は、ステップ1のライセート量の0.5倍量としてください（例、200 µLのライセートを使用した場合、100 µLを加えてください）。高濃度のDNAを得る場合には、Elution bufferを20 µLに減量します。
注意：サンプルの種類や混合方法により、溶出時間や加熱の必要性が異なる場合があります。一般的に、溶出時間は1分で十分ですが、高分子量のDNAサンプルは溶出に時間がかかる場合があります。

10．チューブを磁石スタンドにセットし、sbeadex particlesをペレット化させます（通常20-60秒かかります）。

11．ピペッティングにより溶出液を新しいチューブに移します。

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

7. トラブルシューティング

問題	解決策
プロトコルが十分早くない	下流のアプリケーションで最高純度のDNAを必要としない場合、水洗浄ステップを省略することが可能です。この場合、溶解ステップ前に、Lysis bufferを10 mM Tris pH 8で1：1（v/v）に希釈することを推奨します。この方法を適用する場合、溶出前に結合混合物（上清）を十分に除去することが重要です。水洗浄ステップを省略する場合は、溶出バッファー量を増やすことも推奨します。
磁石でビーズをペレット化する際、記載より時間がかかる	磁石を使用した場合のビーズのペレット化速度は、サンプルの種類と磁石の強さによって異なります。磁化の前にオプションで短時間遠心分離を行うと、ビーズがより早くペレット化されます。
A260/280あるいは A260/230の数値が低い	比率は使用するLysis bufferの種類に依存します。どの溶解バッファーも良好あるいは許容できる比率を示さない場合は、サンプル量過多の可能性があります。 →　サンプル量を減らす、あるいはLysis buffer量を増やしてください A260/280 比が低い場合（1.7以下）： →　溶解時間を延ばす、あるいは溶解に使用するProtease K量を増やしてください →　Elution bufferに 0.1 % (v/v) Tween 20を加えてください
DNA収量が低い	収量は使用するLysis bufferの種類に依存します。どのLysis bufferでも収量が低い場合、Protease Kを添加してください： →　溶出時間あるいは溶解時間を延ばしてください →　温めたElution bufferを使用するか、加熱して溶出してください →　Elution bufferに 0.1 % (v/v) Tween 20を加えてください →　サンプル量を減らす、あるいはLysis bufferを増やしてください まれに、水洗浄でDNAが洗い流されることがあります。 →　水の代わりにWash buffer PN2を使用してください
下流での結果が悪い	→ライセート中の植物残渣が精製工程に残っていないことを確認してください →溶出液が濁っている場合は、スピンダウンして透明な溶出液を回収してください →溶出液に二次代謝物が含まれる可能性があるかどうかは、Lysis bufferの選択によって決まります。
高分子量のDNAが十分に 溶出されない	溶出時間を延ばす（例、10分間）ことで高分子量DNAの収量が増加することがあります。

8. FAQ

ウェブサイトでご覧いただけます。

9. サポート

サポートが必要な場合、reagents@primetech.co.jpまでご連絡ください。

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

@LGCBiosearch | biosearchtech.com

All trademarks and registered trademarks mentioned herein are the property of their respective owners. All other trademarks and registered trademarks are the property of LGC and its subsidiaries. Specifications, terms and pricing are subject to change. Not all products are available in all countries. Please consult your local sales representative for details. No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording or any retrieval system, without the written permission of the copyright holder. © LGC Limited, 2023. All rights reserved. GEN/1158/SW/1123

お問合せ：
プライムテック株式会社
www.primetech.co.jp

ライフサイエンス事業部　バイオ試薬ソリューション部
東京都文京区小石川1-3-25 小石川大国ビル2F
Phone：03-3816-0851（代表）　Fax：03-3814-5080
E-mail：reagents@primetech.co.jp

BIOSEARCH™ TECHNOLOGIES
GENOMIC ANALYSIS BY LGC