

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

本製品は研究用です。診断用途には使用できません。

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

目次

1. 本マニュアルについて	3
2. sbeadex Lightning Chemistryの概要	3
3. キットの構成と保管条件	4
4. 実験手順	4
4.1 実験に必要なもの（キットに含まれないもの）	5
4.2 マグネットとその代替	5
4.3 sbeadex Magnetic Particleの再懸濁	5
4.4 Lysis Bufferにおける沈殿物	5
4.5 Binding Bufferおよび沈殿物の着色	5
4.6 キットを使用するラボ環境	6
4.7 植物サンプルとその保管	6
4.8 植物サンプルの粉碎とホモジナイス（均質化）	6
4.9 溶解に関する推奨事項と結合反応のためのライセートの調製	7
4.10 サンプルインプット量とLysis Bufferの溶液量の最適化	8
4.11 混合	8
5. sbeadex Lightning プロトコルの概要	10
6. sbeadex Lightning Plant DNA Kit DNA精製プロトコルの詳細	11
7. sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit DNA精製プロトコルの詳細	13
8. 自動化	15
8.1 oktopure	15
8.2 KingFisher Flex	16
8.3 その他の自動化プラットフォーム	16
9. トラブルシューティング	17
10. サポート	17

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

1. 本マニュアルについて

sbeadex™ Lightning Plant DNA Kit には2つのフォーマットがあります。

1. 標準バージョン (sbeadex Lightning Plant DNA Kit) :

最大100 mgの新鮮な植物サンプルから手動または自動でDNAを抽出できるように設計されています。チューブまたは96ウェルプレートでの使用に適しています。

2. HTP (ハイスループット) バージョン (sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit) :

384ウェルプレート処理に最適化された小型フォーマットで、ハイスループットアプリケーション向けに反応容量を削減しています。

このマニュアルには、植物サンプルから核酸を手動で精製するための包括的なプロトコルが記載されています。さらに、互換性のあるリキッドハンドリングシステムを使用してプロトコルを自動化する方法についても詳細なガイダンスを提供しています。低スループットと高スループットの両方のガイダンスがあります。

2. sbeadex Lightning chemistryの概要

sbeadex Lightningは、超常磁性微粒子を用い、DNAの結合と洗浄を同時に行う革新的な結合メカニズムを採用しています。洗浄は、水で1回するのみで、有害なエタノール緩衝液や高力オトロピック塩緩衝液を利用したおっくうな洗浄ステップを排除することができます。不純物や潜在的な阻害物質は効率的に除去され、純粋で高品質なDNAが得られます。sbeadex Lightningは、粗抽出法と変わらない速度で、高純度のDNA精製を実現します。また自動化にも対応しています。

sbeadex Lightning chemistryは、PCR、qPCR、シーケンシング、NGS、制限酵素分析など、さまざまな下流のアプリケーションに適した、高収量・高純度・高品質の核酸を提供します。

伝統的なDNA 精製法におけるワークフロー



sbeadex Lightning Plant (HTP) DNA Kitにおけるワークフロー

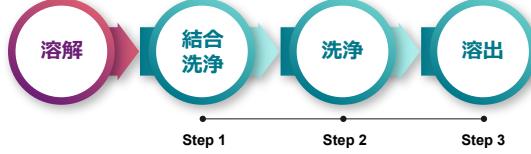


図1. 短縮されたsbeadex Lightning ワークフロー

上のワークフローは、磁気ビーズを用いた場合の典型的なDNA精製プロトコルを表しています。下のワークフローはsbeadex Lightningの革新的なプロトコルを示しています。

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

3. キットの構成と保管条件

sbeadex Lightning Plant Kit

Component	NAP40-035-00 (10 preps*)	NAP40-035-01 (96 preps)	NAP40-035-02 (960 preps)	NAP40-035-03 (10,000 preps)	Storage conditions
Lysis buffer PLA	4 mL	44 mL	440 mL	4,400 mL	Room temperature
Protease K solution	10 µL	100 µL	1 mL	10 mL	Room temperature
debris capture beads	180 µL	1.8 mL	18 mL	180 mL	Room temperature
Binding buffer LPL	2 mL	22 mL	220 mL	2,200 mL	Room temperature
sbeadex particle suspension	220 µL	2.2 mL	22 mL	220 mL	Room temperature
Elution buffer AMP	1 mL	11 mL	110 mL	1,100 mL	Room temperature

表1. sbeadex Lightning Plant Kitに含まれる構成品（型式別の構成品の容量を含む）。

* NAP40-035-00(10preps)は、トライアルキットであるため、ウェブショップからはご購入いただけません。

sbeadex Lightning Plant HTP Kit

Component	NAP40-036-01 (1536 preparations)	NAP40-036-02 (10,000 preparations)	Storage conditions
Lysis buffer PLA	500 mL	2,500 mL	Room temperature
Protease K solution	1 mL	5 mL	Room temperature
debris capture beads	15 mL	100 mL	Room temperature
Binding buffer LPL	110 mL	600 mL	Room temperature
sbeadex particle suspension	10 mL	60 mL	Room temperature
Elution buffer AMP	100 mL	600 mL	Room temperature

表2. sbeadex Lightning Plant HTP Kitに含まれる構成品（型式別の構成品の容量を含む）。

4. 実験手順

植物サンプルは、頑丈な細胞壁やPCR阻害剤となりうる二次代謝産物の存在、組織のタイプの多様性などの構造的多様性により、幅広い課題をもたらします。これらの要因により、単一の標準化されたプロトコルですべてのサンプルタイプに対応することは困難です。以下のセクションでは、個々のプロトコルステップに関する詳細なガイダンスを提供します。サンプルの特性やお客様のニーズに合わせて、実験手順を微調整するサポートを行います。

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

4.1 実験に必要なもの（キットに含まれないもの）

以下に、sbeadex Lightning テクノロジーに基づいた核酸精製をラボで実施するために必要な機器および試薬のリストを示しています。sbeadex Lightning Plant (HTP) DNA Kitに含まれません。忘れずにご準備ください。

必須なもの（ご準備いただくもの）

- マグネットラック、または遠心分離機
- 96ウェルまたは384ウェルプレート（ディープウェルフォーマット）、またはチューブ
- 植物サンプルおよびプレート用の遠心分離機
- ウォーターバス、またはインキュベーター（60°Cまで調節可能なもの）
- 脱塩水、または超純水（pH7未満）

オプション

- RNase A solution (20 mg/mL)

4.2 マグネットとその代替

プロトコル中で、sbeadex magnetic particleをペレット化するためには、マグネット、マグネットプレート、または遠心分離機が必要になります。最適なパフォーマンスを得るためにマグネットの使用を強く推奨します。マグネットを使用しない場合には、遠心分離機を使用することもできます。チューブまたはプレートを最大速度で10秒間遠心分離することによって、sbeadex magnetic particleがコンパクトなペレットを形成します。

4.3 sbeadex Magnetic Particleの再懸濁

sbeadex Magnetic particleの懸濁液を使用する際は、完全に再懸濁させる必要があります。Binding Buffer LPLに添加してDNA結合プレミックスを調製する場合、または直接サンプルに添加する場合に必ず再懸濁してください。不均一な状態の懸濁液を使用すると、精製の化学反応の効率に悪影響を及ぼし、核酸の収量の低下やばらつきを招く可能性があります。

4.4 Lysis Bufferにおける沈殿物

Lysis Bufferを低温で保存されていた場合、塩の沈殿物が形成されることがあります。使用前に必ずバッファーを点検し、目に見える沈殿物がないことを確認してください。沈殿物が形成されている場合は、バッファーを55°Cで30分間インキュベートし、よく振盪して沈殿物を再溶解してください。

4.5 Binding Buffer および沈殿物の着色

Binding Buffer LPLは、時間の経過とともに着色することがあります。これは正常な現象であり、性能には影響しません。高温すぎる環境で保管した場合、Binding Buffer中に沈殿が生じことがあります。溶液を振盪し、8°Cまで冷却することで回復します。沈殿物の量が少量であれば、性能には影響しません。使用前にBinding Bufferを軽く振盪することをお勧めします。

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

4.6 キットを使用するラボ環境

特に記載がない限り、すべてのプロセスは室温（15~25°C）で実施してください。

4.7 植物サンプルとその保管

sbeadex Lightning Plant DNA Kit、およびsbeadex Lightning Plant (HTP) DNA Kitは、葉、塊茎、種子など、さまざまな植物サンプルに最適化されています。植物サンプルは、新鮮（生の）、冷凍、乾燥、またはフリーズドライの状態で処理できます。長期保管には、以下のいずれかの方法を推奨します。

オプションA：瞬間凍結、およびフリーザーでの保管

植物サンプルを液体窒素で瞬間凍結し、その後-70°Cのフリーザーで保管することで、効果的にサンプリング、および保管できます。

オプションB：室温での保管

植物サンプルを、室温で保管する場合は、完全に乾燥させることをお勧めします。また、サンプルを光から保護する必要があります。

Biosearch Technologies社では、植物や種子のサンプルを乾燥し、保管・輸送するために便利なツール（BioArk Leaf and Seed Kits）を提供しています。当社までお問い合わせください。

オプション C: 凍結乾燥

植物サンプルを凍結乾燥した後、室温で長期間保存することができます。

4.8 植物サンプルの粉碎とホモジナイズ（均質化）

植物および種子サンプルを徹底的にホモジナイズすることは、効果的な溶解反応と植物細胞からのDNAの放出に不可欠です。サンプルの処理量と保管条件に応じて、さまざまな均質化オプションが利用可能です。

4.8.1 手作業による粉碎

乳鉢と乳棒、またはマイクロ乳棒を用いた手作業による粉碎は、少量の植物サンプルまたは種子サンプルを処理するのに適した方法です。新鮮なサンプルの場合は、すり潰している間に溶解バッファーを添加する、またはサンプルを液体窒素で瞬間凍結し、凍結中に粉碎することをお勧めします。この方法は、DNAの完全性を維持し、効果的な細胞破壊に役立ちます。

高分子量 (HMW) DNA を必要とする場合は、ホモジナイズする前に組織を手で優しく破碎するか、凍結乾燥することをお勧めします。

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

4.8.2 ボールミルによる粉碎

より高いスループットを得るために、チューブまたはプレート内に鋼球を入れ、ボールミルでホモジナイズする方法をお勧めします。この方法は、大量のサンプルを処理する場合に効果的です。最適化には、ボールミルによる粉碎の前にサンプルを乾燥、凍結乾燥、または凍結する必要があります。これにより、細胞の破壊とDNAの遊離が促進されます。

ホモジナイゼーションの効率は、様々な要因によって影響を受けます（サンプルの種類、量、ホモジナイゼーションに使用するボールの種類、チューブやプレートなど）。DNAの収量と品質に大きな影響を与えるため、サンプルの種類ごとにホモジナイゼーションプロセスを最適化することをお勧めします。

4.9 溶解に関する推奨事項と結合反応用ライセートの調製

本キットには、幅広い植物の葉および種子サンプルにおいて有効性が確認された溶解バッファーが配合されています。本プロトコルには、ほとんどのサンプルタイプで一般的に成功する一般的なガイドラインが記載されています。ただし、特定のサンプルタイプでは、最良の結果を得るために溶解条件の最適化が必要になる場合があります。DNA収量または純度が期待値を下回る場合、溶解パラメータを微調整することによって改善される場合があります。

溶解効率にはいくつかの要因が影響します。

4.9.1 溶解時間

溶解時間は55°Cで10~60分が推奨されます。場合によっては、溶解時間をこの範囲を超えて延長すると結果が改善されることがあります。

4.9.2 溶解温度

Protease K (ProK) による分解のための最適温度は55°Cです。サンプル内の実際の温度は、加熱装置の設定温度よりも低い場合があることにご注意ください。インキュベーション中にサンプルが55°Cに達するかどうか不明な場合は、温度を直接測定してください。温度が低すぎる場合は、最適な条件を確保するために装置の設定温度を上げてください。

4.9.3 溶解バッファー

付属のLysis Buffer PLAは、幅広い植物および種子サンプルに適しています。ただし、植物の種類によっては、DNAを効率的に遊離させ、PCR阻害物質を除去するために、別の溶解バッファーが必要になる場合があります。LGC社では、sbeadex Lightningケミストリーと互換性のある様々な溶解バッファーを開発してきました。6種類の異なる溶解バッファーを含むsbeadex Lightning Starter Kit (NAP40-032-00) をご用意しております。特定のサンプルの種類に合わせて溶解条件を調整できます。

Protease K 濃度:

Lysis Buffer 1mLあたりProtease K solution 2μL (20mg/mL) の使用を推奨します。サンプルによっては、Protease K濃度を上げることでタンパク質分解効率が向上する場合があります。

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

特定のサンプルタイプに対する溶解条件の最適化のための個別のガイダンスについては、弊社バイオ試薬ソリューション部までお問い合わせください reagents@primetech.co.jp

4.10 サンプルインプット量に対する溶解バッファー溶液量の最適化

必要となるサンプルインプット量と溶解バッファーの容量は、植物サンプルの種類や状態によって異なります。組織の種類（葉または種子）、水分含有量（新鮮または乾燥）、サンプル調製方法（4.8参照）などの要因は、溶解効率とライセートの透明度に大きく影響する可能性があります。したがって、一貫したDNA収量と品質を達成するには、ある程度の最適化が必要になる場合があります。新しいサンプルタイプを扱う場合、最適なパフォーマンスを確保するために、溶解バッファーの溶液量を調整されることをお勧めします。

1反応あたりの推奨サンプル量

sbeadex Lightning Plant DNA Kit

通常、新鮮サンプルの場合は最大100 mg、乾燥サンプルの場合は最大20 mgまで使用できます。これらの重量はサンプルの種類によって異なる場合があり、最適化が必要になる場合があります。

sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

HTPは小型のハイスループットフォーマットです。サンプルの特性に応じて、反応あたり新鮮なサンプルでは最大30 mg、または乾燥サンプルでは最大5 mgを超えないようにすることをお勧めします。

新鮮な葉のサンプルを使用する場合、通常250～300 μL のLysis Buffer PLA を添加すると、溶解および遠心分離後の DNA 結合ステップに必要な 200 μL の透明なライセートが生成されます。

乾燥した種子や葉など、バッファーを大量に吸収する可能性のある材料の場合、結合ステップ用のインプットとして200 μL の透明なライセートを得るために、より多量の溶解液（例：450～600 μL ）が必要になる場合があります。溶解液の調製については、プロトコルのセクション6.1を参照してください。

さらに、プロトコルに記載されているように、サンプルと溶解バッファーの比率を最適化すると（例えば400 μL 未満のLysis Buffer PLA を使用すると）、核酸が濃縮され、溶出液中の最終的なDNA濃度が高くなる可能性があります。

4.11 混合

磁性ビーズと試料の適切な混合は、DNA結合、洗浄および溶出プロセスにおいて極めて重要です。

4.11.1 ボルテックスを用いた場合

手動で作業する場合、ボルテックスはDNAの結合、洗浄、および溶出のステップにおいて、混合を確実に適切に行うために、最も効率的な方法の1つです。（短時間の）パルスボルテックスではなく、指定された一定の時間ボルテックスすることを強くお勧めします。

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

4.11.2 マルチウェルプレートのシェーカーによる混合

プロトコルのすべてのステップはマルチウェルフォーマットで実行できます。sbeadex Lightning Plant DNA Kitは96ウェルプレートに対応しています。sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kitは384ウェルプレートでのハイスループット処理に最適化されています。

シェーカーを使用する場合は、高速シェーキング中のクロスコンタミネーションのリスクを最小限に抑えるため、ディープウェルプレートの使用を強くお勧めします。日常的な導入に先立ち、DNA結合、洗浄、溶出の各ステップを通して、徹底的かつ均一な混合を保証する混合パラメータを確立し、検証することをお勧めします。

混合効率をテストし、クロスコンタミネーションを回避するために、染色水を用いて、96ウェル、または384ウェルのディープウェルプレートでワークフローをシミュレーションすることができます。混合の性能を視覚的に評価し、必要に応じて速度や時間を調整します。

サンプルライセート、Bind buffer LPL、およびsbeadex particle suspensionを含む混合液は、水ベースの溶液と比較して粘度が高く、挙動が異なる場合がありますので注意ください。これらの混合液で最適な結果を得るために、混合手順の変更が必要になる場合があります。

シェーカーベースの混合プロトコルの最適化についてサポートが必要な場合は、当社の核酸精製スペシャリストにお問い合わせください。

4.11.3 ピペットによる混合

ピッティングにより上下に混合することで、DNA結合、洗浄、溶出中の適切な混合を確保できます。溶液の粘度が高い、またはビーズの凝集がある場合、ワイドボアチップの使用をご検討ください。また、セクション4.10に記載されているように、サンプルインプット量と溶解バッファー量の最適化もご検討ください。

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

5. sbeadex Lightning プロトコルの概要

このセクションでは、経験豊富なユーザー向けに、簡潔にまとめた1ページプロトコルを提供しています。キットを初めて使用する場合は、セクション6と7に記載されている詳細プロトコルをお読みになることを強くお勧めします。

	sbeadex Lightning Plant DNA Kit tubes or 96-well plate format	sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit 384-well plate format
ホモジナイゼーション	最大100 mg の 新鮮サンプル、または 最大 20 mg の 乾燥サンプル	最大30mgの新鮮サンプル、または 最大 5-10mgの乾燥サンプル
溶解	1 mL PLAにつき2 μ L ProKの割合 400 μ L PLA + ProK 混合液 55 °C、30分間 インキュベート 最大速度で遠心。透明なライセートの取得	1 mL PLAにつき2 μ L ProKの割合 200 μ L PLA + ProK 混合液 55 °C、30分間 インキュベート 最大速度で遠心。透明なライセートの取得
結合	200 μ L 透明なライセート 200 μ L LPL 20 μ L sbeadex particle suspension ピペット or ボルテックス or シェーカーによる混合	50 μ L 透明なライセート 50 μ L LPL 5 μ L sbeadex particle suspension ピペット or ボルテックス or シェーカーによる混合
	マグネットによる分離 上清除去	マグネットによる分離 上清除去
洗浄	マグネットから取り外す 400 μ L 超純水 ピペット or ボルテックス or シェーカーによる混合 1 分間の分離 上清除去	マグネットから取り外す 200 μ L 超純水 ピペット or ボルテックス or シェーカーによる混合 1 分間の分離 上清除去
溶出	マグネットから取り外す 50-200 μ L AMP ピペット or ボルテックス or シェーカーによる混合 60°C、1分間 インキュベート 1 分間の分離 清潔なプレート/チューブに移す	マグネットから取り外す 20-50 μ L AMP ピペット or ボルテックス or シェーカーによる混合 60°C、1分間 インキュベート 1 分間の分離 清潔なプレート/チューブに移す

表3. sbeadex Lightning Plant and sbeadex Lightning Plant HTP プロトコル概要

¹ ProK: Protease K solution

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

6. sbeadex Lightning Plant DNA Kit DNA精製プロトコルの詳細

6.1 サンプルのホモジナイゼーションと溶解

- 最大100mgの新鮮な植物組織、または20mgの乾燥した植物組織をホモジナイズします（推奨のホモジナイゼーションはセクション4.8、サンプルインプットの最適化は4.10を参照してください）。
- 1mLのLysis buffer PLAにつき、2μL のProtease K solution(20mg/mL)と40μLのdebris capture beadsを加え、ライセートを調製します。

注意: Lysis buffer, Protease K solution, debris capture beadsの混合溶解液は室温で24時間安定です。

注意: 下流アプリケーションが、RNAのキャリーオーバーに敏感な場合、RNase Aを用いたRNAの消化が、トータルRNAを効果的に取り除くのに有効な場合があります。1mLのLysis Bufferにつき、5μLのRNase solutionの添加をお勧めしています。RNase solutionはキットに含まれていないことにご注意ください。注文情報は、セクション4.1を参照してください。

- 400μLの調製した溶解液をホモジナイズしたサンプルに加え、しっかりと混合します。
- 注意: 新鮮組織を使用し、ホモジナイゼーションの際にLysis buffer PLAを添加した場合は追加のLysis buffer PLAは不要です。次のステップに進む前に、1mL Lysis buffer PLAにつき、2μL Protease K solution (20mg/mL)と40μL debris capture beadsを忘れずに添加してください。

注意; サンプル量や種類に応じて、Lysis bufferの溶液量を調節してください。溶解した後、ペレットを壊すことなく、200μLの透明なライセートを移せるようにしてください。Lysis bufferの溶液量についてはセクション4.10を参照してください。

- サンプルを55°Cで30分間インキュベートします。

注意: サンプルの種類によって、溶解時間を短縮、または延長します（詳細はセクション4.9を参照してください）。

注意: 効果的な溶解には、混合や定期的な混合が有効です。

- インキュベーション後、デブリ(細胞片) をペレットにするために最高速で5分間遠心します。

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

6.2 結合

- 200µLのBinding buffer LPLと20µLのsbeadex particle suspensionを新鮮なチューブまたはウェルに添加してください。
注意: sbeadex particle suspensionを使用前するに懸濁されていることを確認してください。
- Binding buffer LPLとsbeadex particle suspensionのプレミックスは、室温で少なくとも1か月間安定です。
- 結合用混合液に200µLの透明なライセートを移します。
- 30秒間ボルテックスし、その後、30秒間室温で放置します。
注意: 最適なパフォーマンスを得るために徹底的な混合が重要です。手動の場合、ボルテックスを推奨します。ピペットまたはシェイカーによる混合も使用できます。最適な混合についてはセクション4.11を参照してください。
- 全てのsbeadex particleがペレットを形成するまで、チューブやプレートを、マグネットに接触させます（サンプル種類によりますが、通常15-60秒間程度）。
- 上清を取り除き、捨てます。上清は、ビーズのペレットを剥がさないように可能な限り取り除きます。

6.3 洗浄

- チューブまたはプレートをマグネットから取り外した後、400µLのヌクレアーゼフリーの水を添加します。
注意: 脱塩水または超純水はpH7.0以下のものを使用してください。
- 30秒間ボルテックスし、その後、30秒間室温で放置します。
- 全てのsbeadex particleがペレットを形成するまで、チューブやプレートを、マグネットに接触させます（サンプル種類によりますが、通常15-60秒間程度）。
- 上清を取り除き、捨てます。上清は、ビーズのペレットを剥がさないように可能な限り取り除きます。

6.4 溶出

- チューブまたはウェルプレートをマグネットから取り外し、100µLのElution buffer AMPを添加します。
- 30秒間ボルテックスし、60°Cで1分間インキュベートした後、さらに30秒間ボルテックスします。
注意: サンプルの種類や混合状態によって、溶出時間やインキュベーション温度は異なります。一般的に溶出時間は1分間で十分ですが、高分子DNAサンプルの場合は、効率的な溶出のために、加熱しインキュベーションする必要があります（60°C, 5-10分間）

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

注意: より高濃度のDNAを得るために、溶出バッファーの量を20μLまで減らすことができます。

- 全てのsbeadex particleがペレットを形成するまで、チューブやプレートを、マグネットに接触させます（サンプル種類によりますが、通常15-60秒間程度）。
- 溶出液を新しいチューブまたはプレートに移します。

7. sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit 精製プロトコルの詳細

sbeadex Lightning Plant HTP Kitは、植物サンプルからハイスループットにDNAを精製するために特別に設計されています。プロトコルは384ウェルフォーマットでの使用に最適化されており、迅速かつ費用対効果の高いソリューションを提供します。また96ウェルフォーマットにも対応しており、ニーズに応じた柔軟性を提供します。

下記プロトコルでは、ホモジナイズ、および溶解後の精製ステップの推奨する処理溶液量を説明しています。これらの溶液量は、96ウェルおよび384ウェルフォーマットの両方に適しています。ユーザーはサンプルの種類、およびワークフローの要件に合わせて手順を調整できます。

7.1 サンプルのホモジナイゼーションと溶解

- 最大40mgの新鮮な植物サンプル、または最大5mgの乾燥した植物サンプルをホモジナイズします（ホモジナイズに関する推奨はセクション4.8を参照ください）。
- 溶解用のプレミックスを調製します。1mL のLysis Buffer PLAにつき、2μLのProtease K solution (20mg/mL)および40μLのdebris capture beadsを添加します。

注意: Lysis Buffer, Protease K solution, debris capture beadsのプレミックスは、室温で24時間安定です。

- ホモジナイズしたサンプルに200μLの溶解液を添加し、よく混合します。

注意: 新鮮なサンプルを使用し、ホモジナイゼーションの間にLysis buffer PLAを添加した場合、追加のLysis buffer PLAは不要です。次のステップに進む前に、Lysis buffer PLA 1mLにつき、2μL Protease K solution (20mg/mL)および、40μL debris capture beadsを忘れずに添加してください。

注意: サンプルの種類や量に応じて、ライセートの液量を調節してください。溶解後に、ペレットを壊すことなく、50μLの透明なライセートを移すことができることを確認してください。

- 55°Cで30分間インキュベートします。インキュベーション後、よく混合します。

注意: Lysis bufferの溶液量の推奨は、セクション4.10を参照してください。

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

注意: 効率的な溶解には、定期的な混合が有効です。

- インキュベーション後に、サンプルを最大速度で5分間遠心分離し、細胞の破片をペレット化します。

7.2 結合

- 50μL Binding buffer LPLと5μL sbeadex particle suspensionを清潔なプレートに加えます。

注意: sbeadex particle suspensionを使用する前に、よく混合されていることを確認します。

注意: Binding buffer LPLとsbeadex particle suspensionのプレミックスは室温で少なくとも1か月間安定です。

- 50μLの透明なライセートをbinding mixに加えます。
- ライセートとbinding mix solutionの全体をよく混合するために、室温で少なくとも2分間振盪します。あるいは、効率的なDNAの結合のために、少なくとも10回上下にピペットティングを行い、よく混合します。
- プレートをマグネットにセットし、sbeadex particlesをペレット状にします（通常は15-60秒ほど。サンプルにより異なります）
- 上清を除去し、廃棄します。ペレットを壊さないようにして可能な限り上清を取り除きます。

7.3 洗浄

- プレートをマグネットから取り外し、100μLのヌクレアーゼフリー水を添加します。

注意: 脱塩水または超純水はpH7.0以下のものを使用します。

- プレートを少なくとも2分間振盪しサンプルを混合します。あるいは、ピペットティングを少なくとも10回上下に行い、ペレット状のビーズを再懸濁します。

注意: 上下にピペットティングする際に、ビーズが固まってしまっている場合、広口径のチップの使用を検討してください。

- プレートをマグネットにセットし、sbeadex particlesをペレット状にします（通常は15-60秒ほど。サンプルにより異なります）
- 上清を取り除き、捨てます。上清は、ペレットを剥がさないようにして可能な限り取り除きます。

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

7.4 溶出

- プレートをマグネットから外して、50µLのElution Buffer AMPを添加します。
- サンプルを60-70°Cに設定したシェーカーで少なくとも3分間振盪し混合します。あるいは、にピペッティングを少なくとも10回上下を行い、ペレット状のビーズを再懸濁し、その後2分間60-70°Cでインキュベートします。DNAを効果的に溶出できます。

注意: 高濃度のDNAを必要とする場合、Elution bufferを20µLまで減らすことができます。

注意: サンプルの種類や混合の方法に応じて、溶出時間やインキュベーションの時間は異なる場合があります。

- プレートをマグネットにセットし、sbeadex particlesをペレット状にします（通常は15-60秒ほど。サンプルにより異なります）
- 溶出液を清潔なプレートに移します。

8.自動化

自動化に移行する前に、sbeadex Lightningプロトコルを手動で実施し、使用される特定のサンプルに対して、プロトコルが最適化されていることを確認されることを強くお勧めします。この最適化を実施することで、信頼性の高いベースラインが確立され、その後のパラメータの微調整を行うことができます。

プロトコルの自動化にあたっては、手動抽出時に有効性が確認された試薬の溶液量から開始することをお勧めします。このアプローチは一貫性を確保し、自動化の初期段階におけるトラブルシューティングを容易にします。

Biosearch Technologies社は核酸抽出の自動化において数十年の経験を有しています。同社の研究施設には多様な自動化プラットフォームが導入されており、お客様の自動化プロジェクトをサポートする体制が整っています。お客様のワークフローとゴールに沿った形でsbeadex テクノロジーを導入できるように全力でサポートします。

さらに、お客様の特定の要件を満たすためのパイロットスタディやプロトコルのカスタマイズサービスも提供しています。

sbeadex Lightning Kitは、磁性ビーズベースのキットを扱えるあらゆるリキッドハンドラーや自動化プラットフォームで使用できます。以下のセクションでは、プラットフォームの選択に関するガイドanceスを提供します。

8.1 oKtopure

oKtopure™ (Biosearch Technologies製)は、自動核酸精製プラットフォームです。同社の独自のsbeadex ケミストリーと組み合わせ、高品質かつ高収量のDNA精製をハイスクープットに行うことができます。

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

Biosearch Technologies社では、oKtopureプラットフォーム用に標準スクリプトを提供しています。こちらよりダウンロードいただけます。[oKtopure用標準スクリプト](#)。

sbeadex Lightning Plant (HTP) DNA KitをoKtopure上で使用する場合、またはシステムに関するサポートが必要な場合、当社までご連絡ください。

8.2 KingFisher Flex

KingFisher™ Flex精製システム(ThermoFisher Scientific社製)は、ミディアムロースループットの柔軟性の高いソリューションを提供します。このシステムにおけるワークフローを効率化するため、sbeadex Lightning Plant (HTP) DNA Kitの標準スクリプトを提供しています。複数の溶出時間オプションをサポートしており、様々なサンプルに合わせて容易に調整できます。

sbeadex Lightning ケミストリーは、3つのステップ（結合、洗浄、溶出）のみを必要とするシンプルなソリューションのため、KingFisher Flex システムにおける1回のランで、2x96サンプルのハイスループット処理が可能になります。

Biosearch Technologies社では、特殊なニーズに対応できるよう、ご要望に応じてバッファー量を縮小したカスタムスクリプトを提供しています。サポートが必要な場合、弊社までお問い合わせください。

KingFisher Flex システム用の標準スクリプトについては、以下のリンクをクリックしてください。

- [KingFisher Flex scripts for sbeadex Lightning Plant DNA Kit](#)
- [KingFisher Flex scripts for sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit.](#)

各スクリプトには、バッファー溶液量やプレート位置に関する詳細情報が記載されたプロトコルレポートが付属しています。最適なセットアップと使用方法をサポートします。

プロトコルを調整される場合には、以下のガイドラインにご留意ください。

1. すべての溶液量は、手動の核酸精製の場合と同じにしてください。加熱溶出の時間を長くすると、溶液の蒸発が起こる可能性があります（例：10分間の溶出には、20µLの溶出バッファーの添加をお勧めしています）。
2. 結合と洗浄ステップのインキュベーション時間は、拡散に依存した洗浄効果を考慮し、最短1分としてください。溶出時間は70°Cで、1~10分間行ってください。
3. 洗浄と溶出ステップで混合する前に、「Release Beads」機能を使用し、「bottom mix」を10秒間行ってください。その後、「Fast」設定で自動混合を実行してください。

8.3 その他の自動化プラットフォーム

sbeadex Lightning Plant (HTP) DNA Kitは、その他のリキッドハンドラーDNA精製プラットフォームと互換性があります（例：Hamilton, Opentrons®, Beckman Coulter®, Dynamic Devices, Analytic Jena® or Tecan®など）。

プロトコルの設定の際に、ガイダンスとサポートが必要な場合、弊社までお問い合わせください。

Manual

sbeadex Lightning Plant DNA Kit and sbeadex Lightning Plant HTP DNA Kit

9. トラブルシューティング

課題	解決策
収量が少ない	<p>収量が少ない場合は複数の要因が影響している可能性があります。下記の解決策を参考にしてください。</p> <p>ホモジナイゼーション</p> <p>サンプル間の収量が異なる場合は、ホモジナイゼーションが不完全である可能性があります。</p> <ul style="list-style-type: none">サンプルが完全にホモジナイズされていることを目視で確認してください。サンプルをすり潰す時間や、ボーラミルのスピードを調節することでホモジナイゼーションの最適化を試みてください。入力するサンプル量の調節や、ホモジナイゼーションする前のサンプルの状態の変更を検討してください（例えば、サンプルを完全に乾燥するなど）。 <p>セクション 4.7, 4.8, 4.9 and 4.10をご覧ください。</p> <p>溶解</p> <p>溶解が不完全な場合、収量が少なくなることがあります。</p> <ul style="list-style-type: none">Lysis bufferに沈殿物がないことを確認してください。セクション4.4を参照してください。溶解時間や温度を調節することで、溶解の最適化を試みてください。サンプルとLysis bufferが適切に混合されていることを目視で確認してください。溶解を確実に行うために、サンプルに添加するLysis bufferの溶液量を最適化するようにしてください。ライセート溶液量を正確にしてください。マルチチャネルピペットを使用している場合や自動化をしている場合、粘性の高いライセートやデブリのために、ピペットチップが詰まっている場合があります。そのような場合、ライセートを移す際の詰まりを防ぎ、一貫性を維持するために、口径の広いチップを使用することをお勧めします。サンプルタイプによっては、異なるLysis Bufferを必要とする場合があります。LGC社ではsbeadex Lightning Starter Kitを提供しており、6つの異なるLysis bufferが含まれています。特定のサンプルでは、代替のLysis bufferにより、溶解が改善することがあります。 <p>溶出</p> <p>不完全な溶出によって、収量が少くなることがあります。</p> <ul style="list-style-type: none">溶出時間を延ばす、溶出温度を上げる、混合ステップを追加するなどして溶出を最適化してください。
濃度が低い	<p>収量が少ない場合の要因に加えて、下記が終濃度に影響している場合があります。</p> <p>溶解</p> <ul style="list-style-type: none">サンプルに加える溶解液の溶液量を最適化してください。溶解液の液量を減らすことで終濃度が増えることがあります。終濃度を調節する場合、溶出量を最適化してください。溶出量が多いと回収率が増加し、総収量も高くなる可能性があります。一方で、溶出量が少ないと回収率は減少しますが、終濃度は高くなります。
純度が低い	<p>溶解</p> <ul style="list-style-type: none">ライセートを移す際にサンプルのデブリも移ってしまうと純度に悪影響が出ることがあります。透明なライセートを移すようにしてください。必要に応じて溶解液量を調節してください。sbeadex Lightning Starter Kitには6つの異なるLysis bufferが含まれています。関心のある個々のサンプルによっては、代替のLysis Bufferがより高品質のDNA、特に高純度のDNAをもたらすことがあります。 <p>結合と洗浄</p> <ul style="list-style-type: none">結合と洗浄のステップの間、ビーズが完全に再懸濁されていることを確認してください。DNAの結合と洗浄ステップにおいて、マグネットによる分離ステップの後、上清が完全に除去されていることを確認してください。

10. サポート

本製品に関するさらなるサポートを必要とされる場合、ご遠慮なく下記までご連絡ください。
reagent@primetech@co.jp



本製品は研究用です。診断用途には使用できません。

X f in @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, 2025. All rights reserved.
GEN/1227/SW/0825

BIOSEARCH™
TECHNOLOGIES



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