

Agencourt AMPure XP 使用説明書

● はじめに

Agencourt AMPure XPは、独自のSPRI (solid phase paramagnetic bead) 磁性ビーズ技術を用いた、PCR反応産物を精製するための試薬キットです。AMPure XPは100塩基以上のDNA断片を効率的に回収し、残留プライマー・dNTP・塩・酵素などの共雑物を除去します。

● 精製プロセスの概要

1. 1.0 uLのPCR反応溶液あたり1.8 uLのAMPure XP試薬を加えます。
2. PCR反応産物をSPRI磁性ビーズに結合させます。
3. PCR反応溶液中の共雑物を取り除きます。
4. PCR反応産物の結合したSPRIビーズを、70%エタノールで2回洗浄します。
5. PCR反応産物を溶出します。

● キットの使用条件

Agencourt AMPure XPは96ウェルフォーマットおよび384ウェルフォーマットに対応します。なお、96もしくは384ウェルプレートのウェルをすべて使用しなくても精製は可能で、サンプル数に応じた試薬量を消費します。また、PCR反応溶液の量に合わせて試薬を使用するため、容量の異なる3つのAMPureXP 試薬キット (A63880-AMPure XP 5.0 mL、A63881-AMPure XP 60 mL、A63882-AMPure XP 450 mL) はPCR反応系の容量に対し、下表の通り対応します。

PCR反応系の容量 (96ウェルフォーマットの場合)	AMPureXP 5.0 mL A63880	AMPureXP 60 mL A63881	AMPureXP 450 mL A63882
10 uL	278 反応	3,333 反応	25,000 反応
20 uL	139 反応	1,666 反応	12,500 反応
50 uL	56 反応	667 反応	5,000 反応
100 uL	28 反応	334 反応	2,500 反応

PCR反応系の容量 (384ウェルフォーマットの場合)	AMPureXP 5.0 mL A63880	AMPureXP 60 mL A63881	AMPureXP 450 mL A63882
5 uL	556 反応	6,666 反応	50,000 反応
7 uL	397 反応	4,762 反応	35,714 反応
10 uL	278 反応	3,333 反応	20,000 反応
14 uL	198 反応	2,381 反応	17,857 反応

● キット内容

AMPure XP磁性ビーズ溶液

● キットの保存

キットがお手元に届きましたら4℃で保存してください。
凍結は避けてください。
製造後、12ヶ月間使用可能です。

● その他

AMPure XPの使用には、専用の磁気プレート96R Ring Super Magnet Plate (A32782、96ウェルプレートフォーマット用) もしくは384 Magnet Plate (A29165、384ウェルプレートフォーマット用) が必要となります。

● 操作法

96ウェルフォーマットの場合：

1. PCR反応溶液を、新たな96ウェルプレートに移し変えるべきか否かを確認する。

PCR反応溶液の2.8倍量がPCRプレートのウェル容量を超える場合は、300 uLの容量の丸底ウェル型の96ウェルプレートに移し変える。

2. 穏やかに、しかし確実に磁性ビーズが十分にリサスペンドされるようにAMPure XP試薬を転倒混和する。続いて、下表に基づきPCR反応溶液にAMPure XP試薬を加える。

PCR反応溶液量 (uL)	添加するAMPure XPの試薬量 (uL)
10	18
20	36
50	90
100	180

* (添加するAMPure XPの試薬量) = 1.8 X (精製するPCR反応溶液量)

3. ピペッティングを10回繰り返し、PCR反応溶液とAMPure XPを十分混和する。その後、回収率を上げるために室温で5分間静置する。

このステップで100塩基以上のPCR反応産物が試薬中の磁性ビーズに結合する。再現性を得るために、ピペッティングによる混和を推奨する。混和後、溶液は均一な茶色となる。

4. ステップ3後の96ウェルプレートを96 Super Ring Magnet Plateに設置し、2分間静置する。

Magnet Plateの磁石に磁性ビーズが引き寄せられ、溶液が透明になる。

5. 96ウェルプレートを96 Super Ring Magnet Plateに設置したまま、Magnet Plateの磁石付近に集積した磁性ビーズに触れないようにPCR反応溶液を取り除く。

もし磁石に引き寄せられたビーズが溶液中に混和してしまった場合は、できる限り磁性ビーズを吸い取らないように、数 uLの溶液をウェルに残したままにする。

6. 個々のウェルに200 uLの70%エタノールを添加し、30秒間静置する。その後、エタノールを取り除く。続いてこのステップをもう一度繰り返す。

96ウェルプレートを96 Super Ring Magnet Plateに設置したまま行うこと。Magnet Plateの磁石に引き寄せられた磁性ビーズを乱さないように行う。また、できる限りエタノールを取り除く。

注：風乾も可能だが、5分以内とし過度の風乾は避ける。過度に風乾した場合（集積した磁性ビーズにひび割れが生じる）、溶出効率が著しく低下する。

7. 96ウェルプレート[®]を96 Super Ring Magnet Plateから外し、40 uLの溶出バッファ（精製水、トリス酢酸pH 8.0、もしくはTE）をそれぞれのウェルに添加し、ピペッティングを10回繰り返す。

溶出バッファは40 uL以上でもかまわない。一方、40 uL未満の場合は磁性ビーズと十分混和するように留意する（それでも溶出効率が低下する可能性がある）。

8. 再び96ウェルプレート[®]を96 Super Ring Magnet Plateに設置し、1分間静置する。

9. 96ウェルプレート[®]を96 Super Ring Magnet Plateに設置したまま、溶出液を回収する。

384ウェルフォーマットの場合：

1. 穏やかに、しかし確実に磁性ビーズが十分にリサスペンドされるようにAMPure XP試薬を転倒混和する。続いて、下表に基づきPCR反応溶液にAMPure XP試薬を加える。

PCR反応溶液量 (uL)	添加するAMPure XPの試薬量 (uL)
5	9
7	12.6
10	18
14	25

* (添加するAMPure XPの試薬量) = 1.8 X (精製するPCR反応溶液量)

注：384ウェルプレートでは、ウェル容量の制限により、14 uLを超えるPCR反応溶液の精製は行えない（14 uL PCR反応溶液 + 25 uL AMPure XP = 39 uL）。

2. PCR反応溶液とAMPure XPを十分混和する。

ピペッティングを15回行う。混和後、溶液は均一な茶色となる。

3. ステップ2後の384ウェルプレート[®]を384 Magnet Plateに設置し、3分間静置する。

Magnet Plateの磁石に磁性ビーズが引き寄せられ、溶液が透明になる。

4. 384ウェルプレート[®]を384 Magnet Plateに設置したまま、Magnet Plateの磁石付近に集積した磁性ビーズに触れないようにPCR反応溶液を取り除く。

5. 個々のウェルに30 uLの70%エタノールを添加し、30秒間静置する。その後、エタノールを取り除く。続いてこのステップをもう一度繰り返す。

384ウェルプレート[®]を384 Magnet Plateに設置したまま行うこと。Magnet Plateの磁石に引き寄せられた磁性ビーズを乱さないように行う。また、できる限りエタノールを取り除く。

注：風乾も可能だが、5分以内とし過度の風乾は避ける。過度に風乾した場合（集積した磁性ビーズにひび割れが生じる）、溶出効率が著しく低下する。

6. 384ウェルプレートから384 Magnet Plateを外し、30 uLの溶出バッファ（精製水、トリス酢酸pH 8.0、もしくはTE）をそれぞれのウェルに添加し、ピペッティングを10回繰り返す。

溶出バッファは30 uL以上でもかまわない。一方、15 uL未満の場合は磁性ビーズと十分混和するように留意する（それでも溶出効率が低下する可能性がある）。

7. 再び384ウェルプレートを384 Magnet Plateに設置し、溶出液を回収する。