

GenFind V3 追加プロトコル 培養細菌サンプルからの DNA 抽出



本追加プロトコルは簡易版です。使用前には、正式な製品マニュアルと Supplemental Protocol (英文) を必ずご一読ください。

グラム陽性菌、グラム陰性菌の両タイプの細菌から、ゲノム DNA を抽出します。

Material Supplied by the User

96 ウェル 1.2 mL ディープウェルプレート

例: Thermo Scientific product # AB-1127

1.5 mL マイクロチューブ

V&P Scientific 7 Bar Magnet for 96-Well Plate # 771MWZM-1ALT

試薬

2×YT などの培地

100%エタノール

RNase A (100 mg/mL)

Lysozyme (100 mg/mL)

PBS (pH 7.4)

ヌクレアーゼフリー水

Wash WBC 溶液の調製

Wash WBC のボトルに、100% エタノールを Small Kit (C34880) の場合は 72 mL、384 preps の場合は 375 mL 加え、混合します。調製後の溶液は、室温で保存します。

Purification Procedure

1. 細胞溶解

- a. 培養液 500 μ L を 1.5 mL マイクロチューブに加えます。
一晩の培養で OD 1 を超えない場合には、500 μ L 以上の培養液を入れて下さい。
- b. チューブを 5,000 $\times g$ 10 分間 (細菌により適時調整) で遠心分離し、上清を除去します。
- c. PBS 200 μ L で再懸濁します。
- d. 懸濁液 200 μ L を 96 ウェル 1.2 mL ディープウェルプレート (反応プレート) に移します。
- e. Lysozyme (100 mg/mL) 12 μ L を加えます。
- f. ピペッティング 10 回により混合します。
- g. 37°C で 30 分間反応します。
- h. Lysis LBB 500 μ L を加えます。
- i. Proteinase K 30 μ L を加えます。
- j. RNase A (100 mg/mL) 1 μ L を加えます。
- k. ピペッティング 10 回により混合します。
- l. 65°C で 2 時間反応します。

2. 結合

- a. Bind BBB のボトルをボルテックスし、磁性ビーズを完全に再懸濁します。
- b. Bind BBB 300 μ L を加えます。
- c. ピペッティング 10 回により混合します。
- d. 室温で 5 分間静置します。
- e. 反応プレートを磁気プレート上で 15 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- f. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
- g. 反応プレートを磁気プレートから下ろします。

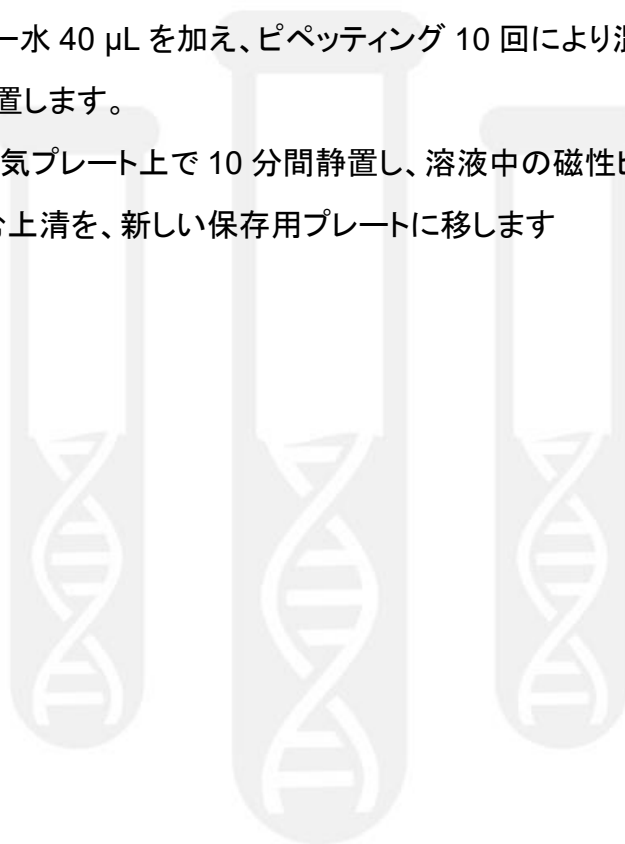
3. 洗浄

- a. Wash WBB 800 μ L を加えます。
- b. ピペッティング 10 回により混合します。
- c. 反応プレートを磁気プレート上で 10 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- d. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
- e. 反応プレートを磁気プレートから下ろします。

- f. 3.a~3.e のステップを繰り返し行い、合計 2 回の Wash WBB 洗浄を行います。
- g. Wash WBC 溶液 800 μ L を加えます。
- h. ピペティング 10 回により混合します。
- i. 反応プレートが磁気プレート上で 10 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- j. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
- k. 反応プレートを磁気プレートから下ろします。
- l. 3.g~3.k のステップを繰り返し行い、合計 2 回の Wash WBC 洗浄を行います。

4. 溶出

- a. ヌクレアーゼフリー水 40 μ L を加え、ピペティング 10 回により混合します。
- b. 室温で 5 分間静置します。
- c. 反応プレートを磁気プレート上で 10 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- d. 溶出 DNA を含む上清を、新しい保存用プレートに移します



Example Data

E. coli, *S. aureus*, *Salmonella*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* それぞれについて、一晩培養した培養液からゲノム DNA 抽出を行いました。

E. coli, *S. aureus* から抽出した DNA については、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) で評価を行いました (Table 1)。ゲノム DNA の品質については、Agilent Genomic DNA Screen Tape で評価を行い、DIN は、*E. coli* で 8.9、*S. aureus* で 9.6 でした (Figure 1)。これらの高い DIN は、抽出過程でゲノム DNA の分解がほとんど起きていないことを示しています。

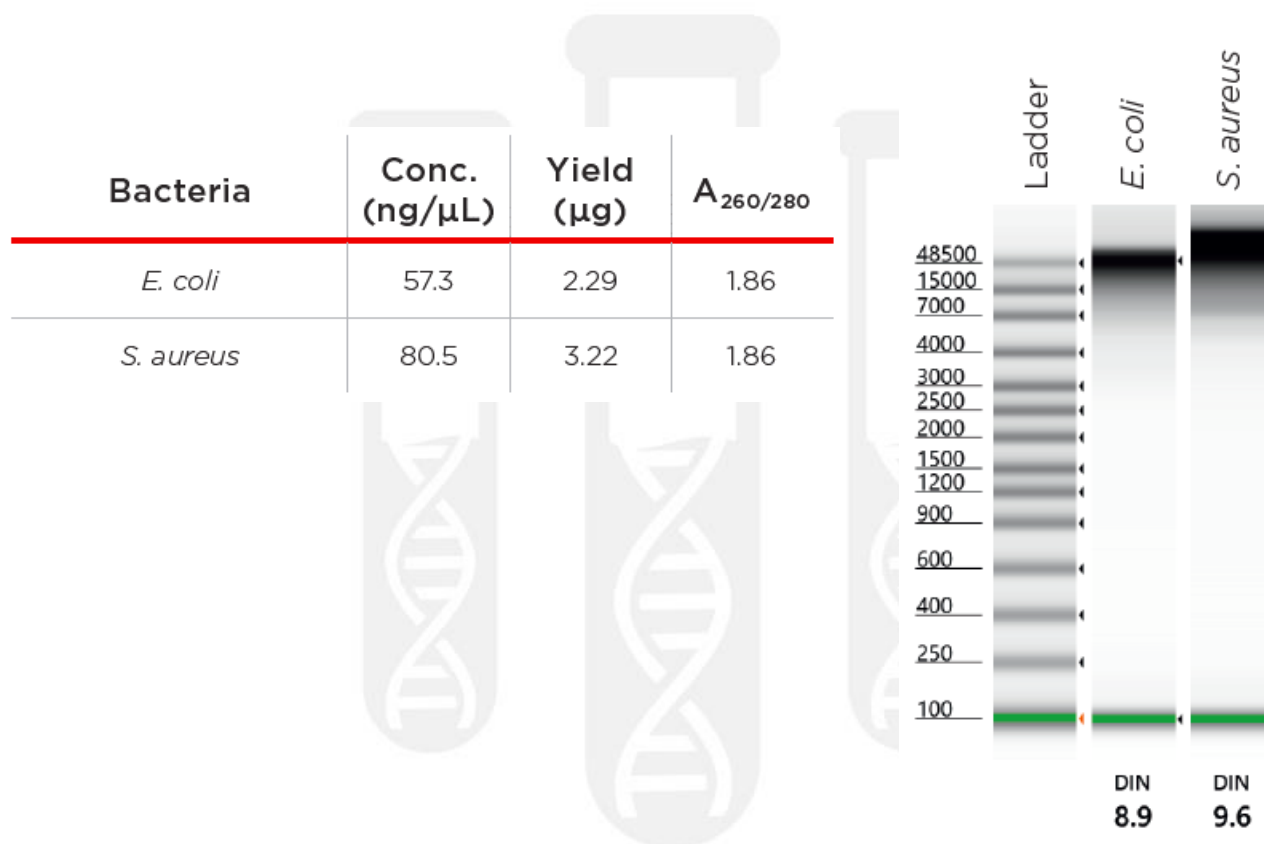


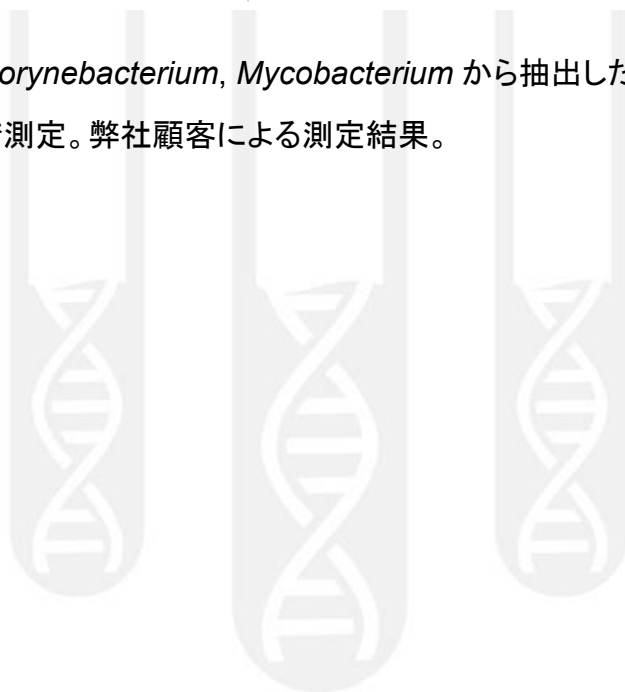
Table 1. グラム陽性菌 *S. aureus* とグラム陰性菌 *E. coli* から抽出した DNA の濃度、収量、A₂₆₀/A₂₈₀ を、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) で測定。

Figure 1. *S. aureus* と *E. coli* から抽出した DNA の精製度を、Agilent Genomic DNA Screen Tape で測定。

Salmonella, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* から抽出した DNA については、Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) で DNA 蛍光定量を行いました (Table 2)。予想通り、*Mycobacterium* の収量は他の 2 種よりもかなり低くなりました。これは、*Mycobacterium* の細胞数が少ないことに起因します。

Genus	Average DNA concentration (ng/μL)
<i>Salmonella</i>	62.2
<i>Corynebacterium</i>	42.2
<i>Mycobacterium</i>	1.3

Table 1. *Salmonella*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* から抽出した DNA の濃度を、Qubit dsDNA HS Assay Kit で測定。弊社顧客による測定結果。



210217_SP-JP_GenFindV3_BacterialDNA

ベックマン・コールター株式会社

本社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 ☎ 0120-566-730 ☎ 03-6745-4704 ☎ 03-5530-2460
 ✉ bckkcas@beckman.com 🌐 <http://www.beckmancoulter.co.jp>

