

GenFind V3 追加プロトコル 糸状菌 (真菌) 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。

Aspergillus や *Penicillium* などの糸状菌 (真菌) からゲノム DNA を抽出する本追加プロトコルでは、凍結融解、Lysozyme 処理、ビーズ破碎の 3 種類の方法を紹介しています。主として行われるビーズ破碎は自動化には適さない方法ですが、自動化に適する他の 2 つの方法がビーズ破碎と遜色ない DNA 収量であることを示します。

Material Supplied by the User

96 ウェル 2 mL ディープウェルプレート

例: Beckman Coulter # 609681

0.5 mm glass beads

例: Sigma-Aldrich # Z250465

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

試薬

2×YT などの培地

80%エタノール (ヌクレアーゼフリー水で用事調製)

Lysozyme (10 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 (培養液 200 μ L 以下を凍結融解法で破碎)

菌類は、2×YT などのリッチな培地でのプレート培養か一晚の液体培養を行って下さい。プレート培養の場合は、菌体を PBS 200 μ L で再懸濁して下さい。

1. 細胞の凍結融解

- a. 培養液 200 μ L を 96 ウェル 2 mL ディープウェルプレートに加えます。
- b. Lysis LBB 500 μ L を加えます。
- c. Proteinase K 30 μ L を加えます。
- d. Lysozyme (10 mg/mL) 4 μ L を加えます。
- e. ピペティング 10 回により混合します。
- f. -80°C で 10 分間凍結します。
- g. 室温で 5 分間融解します。
- h. 37°C で 30 分間反応します。

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. 80%エタノール 100 μ L を加えます。
- d. ピペティング 10 回により混合します。
- e. 室温で 5 分間静置します。
- f. 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。
- g. 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。
- h. 反応プレートを磁気プレートから下ろします。

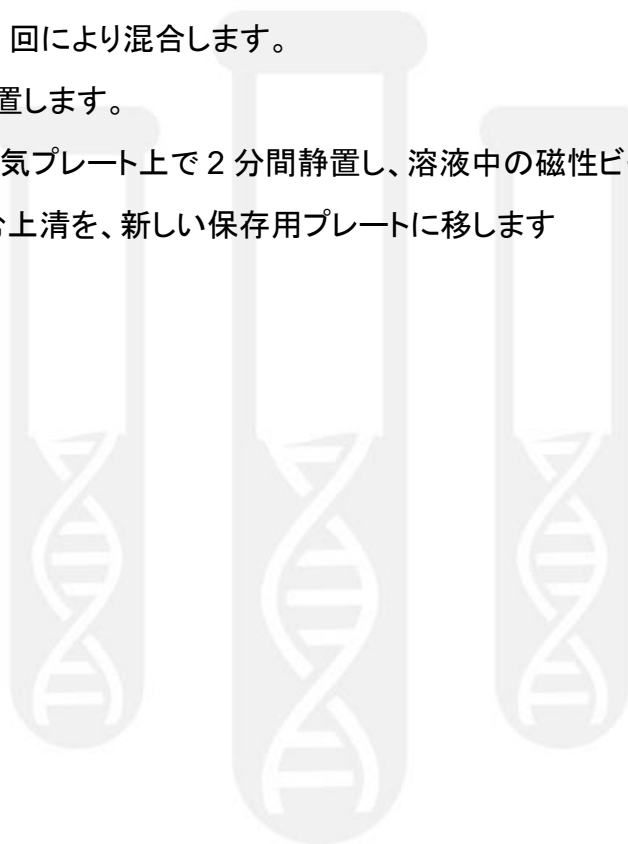
3. 洗浄

- a. Wash WBB 溶液 800 μ L を加えます。
- b. ピペティング 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 1600 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 6 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 溶液洗浄を行います。

4. 溶出

- a. ヌクレアーゼフリー水 40 μ L を加えます。
- b. ピペティング 10 回により混合します。
- c. 室温で 2 分間静置します。
- d. 反応プレートを磁気プレート上で 2 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- e. 溶出 DNA を含む上清を、新しい保存用プレートに移します



Purification Procedure (培養液 200 μ L 以下を Lysozyme で溶解)

菌類は、2×YT などのリッチな培地でのプレート培養か一晚の液体培養を行って下さい。プレート培養の場合は、菌体を PBS 200 μ L で再懸濁して下さい。

1. ビーズ破碎

- a. 培養液 200 μ L を 96 ウェル 2 mL ディープウェルプレートに加えます。
- b. Lysis LBB 500 μ L を加えます。
- c. Proteinase K 30 μ L を加えます。
- d. Lysozyme (10 mg/mL) 4 μ L を加えます。
- e. ピペティング 10 回により混合します。
- f. 65°C で 1 時間反応します。

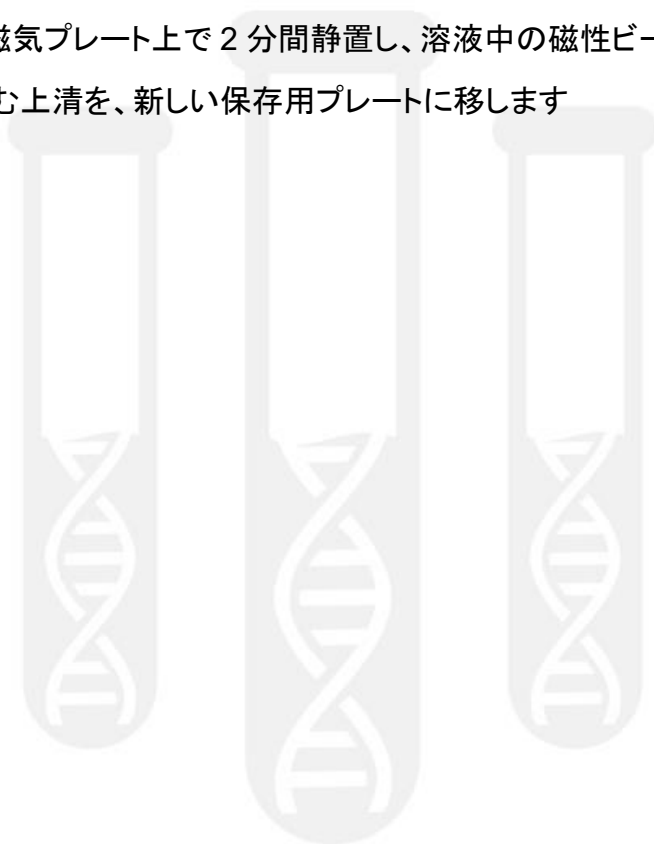
2. 結合

- 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. 80%エタノール 100 μ L を加えます。
- d. ピペティング 10 回により混合します。
- e. 室温で 5 分間静置します。
- f. 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。
- g. 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。
- h. 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 溶液 800 μ L を加えます。
- b. ピペティング 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 1600 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. 反応プレートを磁気プレート上で 6 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 溶液洗浄を行います。
4. 溶出
- a. ヌクレアーゼフリー水 40 μ L を加えます。
 - b. ピペティング 10 回により混合します。
 - c. 室温で 2 分間静置します。
 - d. 反応プレートを磁気プレート上で 2 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
 - e. 溶出 DNA を含む上清を、新しい保存用プレートに移します



Purification Procedure (培養液 200 μ L 以下をビーズで破碎)

菌類は、2×YT などのリッチな培地でのプレート培養か一晚の液体培養を行って下さい。プレート培養の場合は、菌体を PBS 200 μ L で再懸濁して下さい。

1. 細胞溶解

- a. 0.5 mm glass beads 0.5 g を 96 ウェル 2 mL ディープウェルプレートに加えます。
- b. 培養液 200 μ L を加えます。
- c. Lysis LBB 100 μ L を加えます。
- d. ヌクレアーゼフリー水 100 μ L を加えます。
- e. ビーズビーター最高速度 (≥ 1200 rpm) で 3 分間ビーズ破碎します。
- f. 上清を新しい 96 ウェル 2 mL ディープウェルプレートに移します。
- g. Proteinase K 30 μ L を加えます。
- h. Lysozyme (10 mg/mL) 4 μ L を加えます。
- i. Lysis LBB 400 μ L を加えます。
- j. ピペッティング 10 回により混合します。
- k. 37°C で 30 分間反応します。

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。

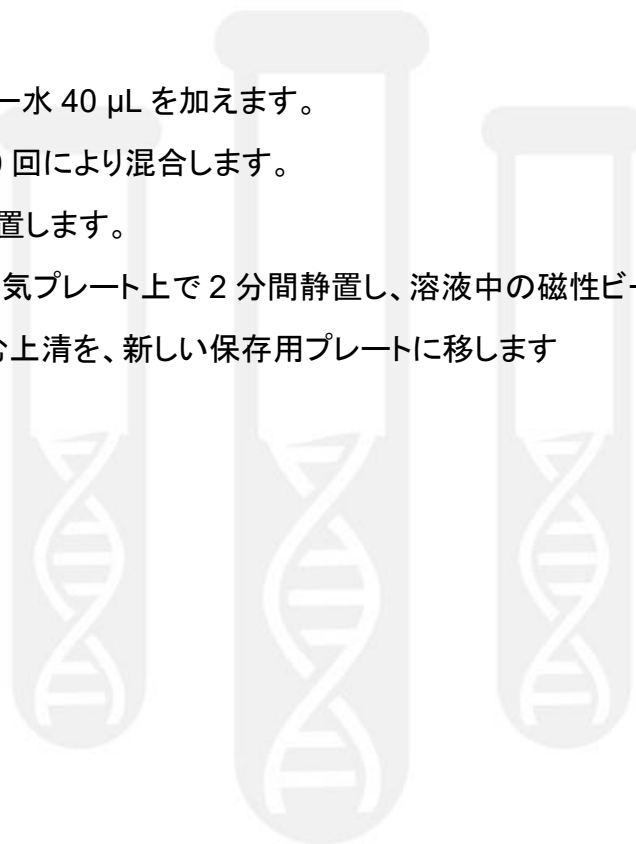
3. 洗浄

- a. Wash WBB 溶液 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 1600 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[®]を磁気プレート上で 6 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 溶液洗浄を行います。

4. 溶出

- a. ヌクレアーゼフリー水 40 μ L を加えます。
- b. ピペティング 10 回により混合します。
- c. 室温で 2 分間静置します。
- d. 反応プレート[®]を磁気プレート上で 2 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- e. 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

A. nigerからのゲノム DNA 抽出

2 週間培養した後に、4°Cで2ヶ月間保存したYTプレート上から掻き取った *Aspergillus niger* 菌体（孢子を含む）をサンプルとしました。菌体をPBSで懸濁し3等分したサンプルを、凍結融解、Lysozyme 処理、ビーズ破碎のそれぞれの追加プロトコルでDNAの抽出を行いました。ビーズ破碎法はもっとも高いDNA収量であり、菌体に含まれる大量の孢子からもDNAを抽出できることが理由であると考えられます(Figure 1)。凍結融解法とLysozyme 処理法は、ビーズ破碎法の約半分の収量でしたが、自動化に適したハイスルーブット処理に適した方法です(Figure 2)。Lysozyme 処理法で得られたDNAは、A260/A280 指標で最も高い精製度を示していました(Data not shown)。

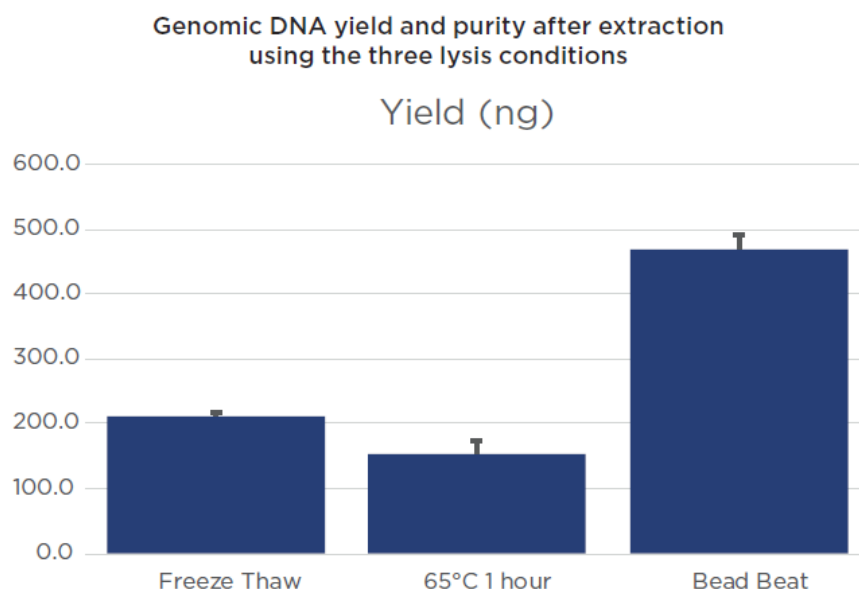


Figure 1. *A. niger* から、凍結融解、Lysozyme 処理、ビーズ破碎のそれぞれの方法で抽出したDNAの平均収量。SD, n=3

210217_SP-JP_GenFindV3_FungalDNA

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>