

## GenFind v3 追加プロトコル ムコイド型細菌からの 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。

ムコイド型細菌(例: 緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa*)は、細胞外に多糖を大量分泌します。多糖に由来する粘度は、カラムを詰まらせたり磁性ビーズの磁石への結合を阻害したりして、精製産物に多糖の混入をもたらします。本追加プロトコルは、サンプル粘度を低下させ、精製産物への糖の混入を低減します。

### Material Supplied by the User

1.2 mL 96 ウェルプレート

例: ThermoFisher Scientific, AB1127

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

1.5 mL マイクロチューブ

### 試薬

100%エタノール

ヌクレアーゼフリー水

0.5 M EDTA

50% w/v PEG 8000

LB 培地

RNase A, Beckman Coulter, B85620

### Wash WBC 溶液の調製

Wash WBC のボトルに 100%エタノールを、Wash WBC : 100%エタノール = 1 : 3 の割合で加え、混合します。調製後の溶液は、室温で保存します。

## Purification Procedure

### 1. サンプル調製

- a. LB 培地で細菌を一晩培養します。
- b. 培養液 1 mL を 1.5 mL マイクロチューブに移します。
- c. 3,000× *g* で 5 分間遠心分離します。
- d. 上清を除去します。
- e. 50% w/v PEG 8000 80  $\mu$ L、0.5 M EDTA 400  $\mu$ L、ヌクレアーゼフリー水 360  $\mu$ L で再懸濁します。
- f. 3,000× *g* で 5 分間遠心分離します。
- g. 上清を除去します。

### 2. 細胞溶解

- a. Lysis LBB 200  $\mu$ L を加えます。
- b. 0.5 M EDTA 200  $\mu$ L を加えます。
- c. Proteinase K 30  $\mu$ L を加えます。
- d. RNase A 1  $\mu$ L を加えます。
- e. ピペティング 10 回により混合します。
- f. 1.2 mL 96 ウェルプレートに移します。
- g. 55°C で 30 分間反応します。

### 3. 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  $\mu$ L を加え、混合します。
- c. 室温で 5 分間静置します。
- d. 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。
- e. 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。
- f. 反応プレートを磁気プレートから下ろします。

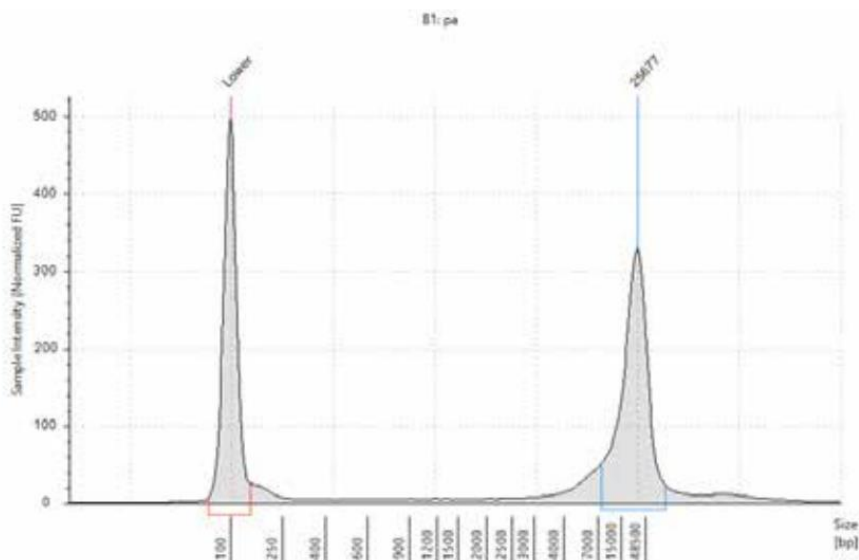
### 4. 洗浄

- a. Wash WBC 溶液 800  $\mu$ 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 3 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<sup>®</sup>を磁気プレート<sup>®</sup>上に置いたままで、上清を除去します。
  - e. 反応プレート<sup>®</sup>を磁気プレート<sup>®</sup>から下ろします。
  - f. Wash WBB 800  $\mu$ L を加えます。
  - g. ピペッティング 10 回により混合します。
  - h. 反応プレート<sup>®</sup>を磁気プレート<sup>®</sup>上で 6 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
  - i. 反応プレート<sup>®</sup>を磁気プレート<sup>®</sup>上に置いたままで、上清を除去します。
  - j. 反応プレート<sup>®</sup>を磁気プレート<sup>®</sup>から下ろします。
  - k. 4.f~4.j 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。
  - l. Wash WBC 溶液 800  $\mu$ L を加えます。
  - m. ピペッティング 10 回により混合します。
  - n. 反応プレート<sup>®</sup>を磁気プレート<sup>®</sup>上で 3 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
  - o. 反応プレート<sup>®</sup>を磁気プレート<sup>®</sup>上に置いたままで、上清を除去します。
  - p. 磁気プレート<sup>®</sup>上で 1 分間風乾します。
  - q. 反応プレート<sup>®</sup>を磁気プレート<sup>®</sup>から下ろします。
5. 溶出
- a. ヌクレアーゼフリー水 40  $\mu$ L を加え、混合します。
  - b. 室温で 2 分間静置します。
  - c. 反応プレート<sup>®</sup>を磁気プレート<sup>®</sup>上で 2 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

*P. aeruginosa* のオーバーナイト培養液から抽出したゲノム DNA の分解程度は、Agilent Genomic DNA Screen Tape で評価され、DIN は 8.5 でした (Figure 1)。



**Figure 1.** An Agilent Genomic DNA Screen Tape of DNA extracted from *P. aeruginosa*. The electropherogram of one of the replicates is shown above. The DIN score for this sample was 8.5 indicating intact genomic DNA.



210217\_SP-JP\_GenFindV3\_MucoidDNA

## 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 URL <http://www.beckmancoulter.co.jp>

