

RNAdvance Tissue 追加プロトコル 培養細菌サンプルからの RNA 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。

培養細菌から RNA を抽出します。

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

試薬

Beckman Coulter RNAdvance Tissue, A32646, A32649 or A32645

鶏卵白由来 Lysozyme (例: Sigma-Aldrich, L6876)

100%イソプロパノール

70%エタノール(ヌクレアーゼフリー水で用時調製)

ヌクレアーゼフリー水

Wash WBD 溶液の調製

Wash WBD (Wash Buffer) のボトルに 100%イソプロパノールを、Wash WBD (Wash Buffer) : 100%イソプロパノール = 3 : 2 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. 細菌のオーバーナイト培養液 (OD < 6.5) 150 μ L を、1.2 mL 96 ウェルプレートに移します。
- b. 3,000 \times *g* で 5 分間遠心分離します。
- c. 上清を除去します。

2. 細胞溶解

- a. Lysis LBE 400 μ L を加えます。
- b. Proteinase K 20 μ L を加えます。
- c. Lysozyme (100 mg/mL) 4 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. 37°C で 30 分間反応します。

3. 結合

- a. Bind BBC 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 BBC 80 μ L と 100%イソプロパノール 320 μ L を混合します。
- c. 反応プレートに、3.b.で調製した BBC 溶液 400 μ L を加え混合します。
- 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。

4. 洗浄

- a. Wash WBD 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 7 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。

5. エタノール洗浄

- f. 70%エタノール 800 μ L を加えます。
- g. ピペティング 10 回により混合します。

- h. 反応プレートを磁気プレート上で4分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- i. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
- j. 反応プレートを磁気プレートから下ろします。

6. DNase I 処理

- a. DNase I 溶液 100 μ L (ヌクレアーゼフリー水 80 μ L、DNase I 10 μ L、10 \times DNase I Buffer 10 μ L) を加えます。
- b. 室温で1分間静置します。
- c. ピペティング 10 回により混合します。
- d. 37 $^{\circ}$ Cで15分間反応します。

7. 再結合

- a. Wash WBD 550 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5分間静置します。
- d. 反応プレートを磁気プレート上で6分間 (必要に応じてそれ以上) 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。

8. エタノール洗浄 (このステップは、磁気上で行います)

- a. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、70%エタノール 600 μ L を加えます。
- b. 反応プレートを磁気プレート上で1分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- c. 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。
- d. 8.a.~8.c.の洗浄を繰り返し、合計3回の70%エタノール洗浄を行います。
- e. 反応プレートを磁気プレートから下ろします。

9. 溶出

- a. ヌクレアーゼフリー水 40 μ 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。
- d. 溶出 RNA を含む上清を、新しい保存用プレートに移します

Example Data

LB 培地で 37°C のオーバーナイト培養 (*Escherichia coli* は OD 6.59、*Bacillus subtilis* は OD 4.15、*Streptococcus salivarius* は OD 0.94) し、各培養液 150 μ L から RNA 抽出を行いました。収量は NanoDrop (ThermoFisher Scientific) で 260 nm の吸光度により測定し、RNA 分解程度は Agilent TapeStation により測定しました。

RNA 収量は菌体量に対応しており、量の数が多いほど収率が高くなりました (Figure 1)。抽出 RNA は分解が少なく、*E. coli* では RIN 8.4、*B. subtilis* では RIN 9.4、*S. salivarius* では RIN 7.4 でした (Figure 2)。本追加プロトコルは、様々な細菌種の RNA 抽出に対応し、抽出 RNA は高品質でした。

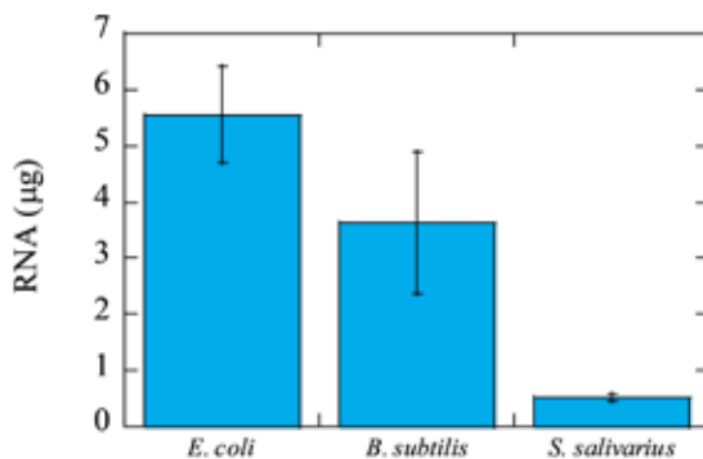


Figure 1. RNA 収量は 260 nm での吸光度で測定しました (n=3)。

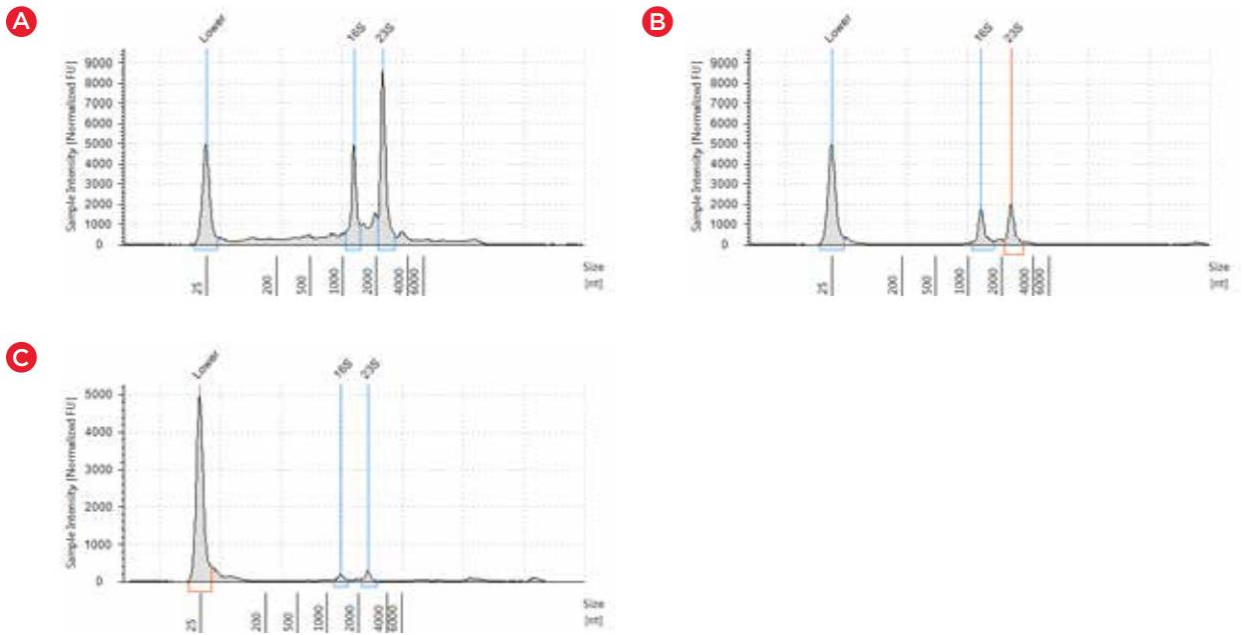
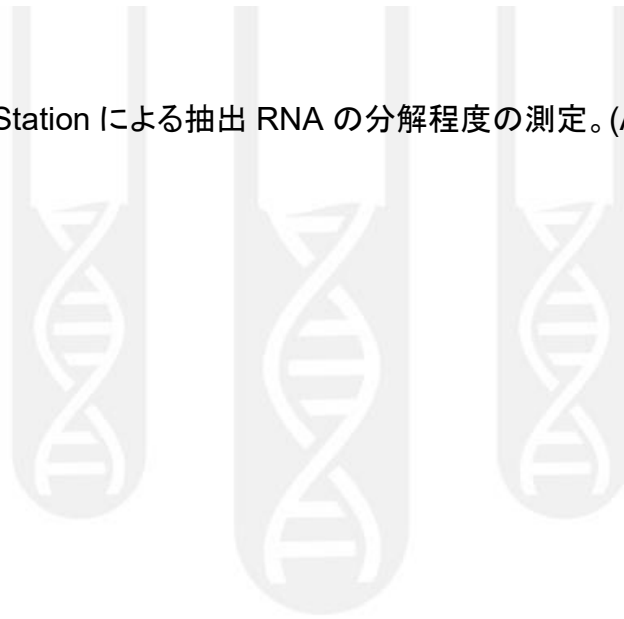


Figure 2. Agilent TapeStation による抽出 RNA の分解程度の測定。(A) *E. coli*, (B) *B. subtilis*, (C) *S. salivarius*



210216_SP-JP_RNAAdvanceTissue_BacterialRNA

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>

