

RNAdvance Tissue 追加プロトコル ムコイド型細菌からの 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。

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: Thermo Fisher Scientific, AB1127

V&P Scientific 7 Bar Magnet, VP 771MWZM-1ALT

試薬

100%イソプロパノール

100%エタノール

70%エタノール (ヌクレアーゼフリー水で用時調製)

PEG EDTA (5% PEG, 0.25M EDTA)

0.5M EDTA

DNase I (RNase フリー; 2 U/ μ L)、DNase I Buffer

ヌクレアーゼフリー水

Reagent Preparation

1. Proteinase K 50 mg/mL 溶液を調製します。

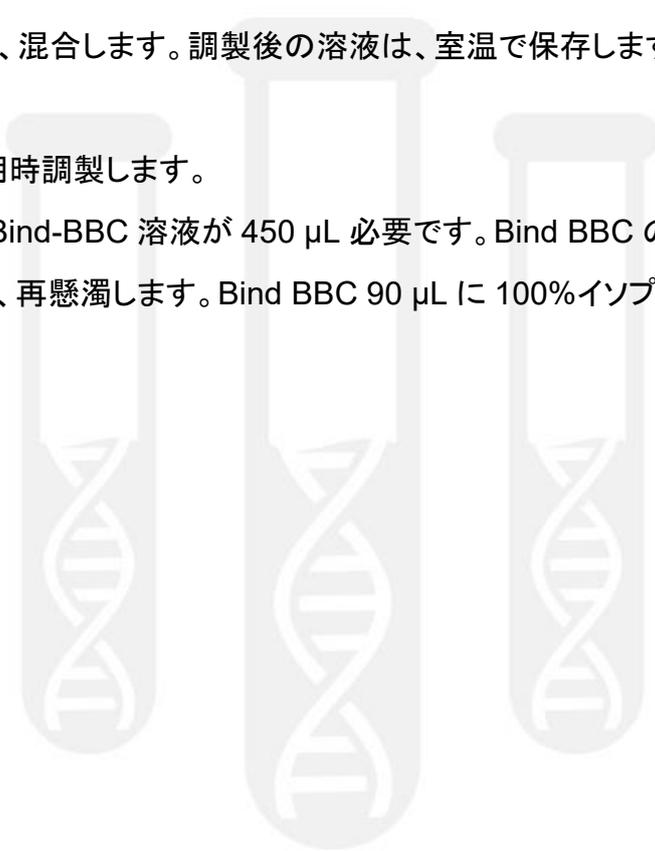
Proteinase K のボトルに Proteinase K Buffer を、ラベルに記載された容量加え、混合します。調製後の溶液は、 -20°C で保存します。

2. Wash WBD 溶液を調製します。

Wash WBD のボトルに 100%イソプロパノールを、Wash WBD : 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。

3. Bind-BBC 溶液を用時調製します。

1 サンプルあたり、Bind-BBC 溶液が $450\ \mu\text{L}$ が必要です。Bind BBC のボトルを少なくとも 30 秒間ボルテックスし、再懸濁します。Bind BBC $90\ \mu\text{L}$ に 100%イソプロパノールを $360\ \mu\text{L}$ を加え、混合します。



Purification Procedure

1. 細胞調製

- a. LB 培地で細菌を一晩培養します。
- b. 培養液 200~500 μL を 3,000 $\times g$ 5 分間で遠心分離します。
- c. 上清を除去します。

2. 細胞洗浄

- a. サンプルを PEG EDTA (5% PEG, 0.25M EDTA) 800 μL で再懸濁します。
- b. サンプルを反応プレートに入れます。
- c. 反応プレートを 3,000 $\times g$ 10 分間で遠心分離します。
- d. 上清を除去します。

3. 細胞溶解

- a. Lysis LBE 380 μL 、Proteinase K (50 mg/mL; Reagent Preparation ステップ 1) 溶液 20 μL 、0.5M EDTA 100 μL で再懸濁します。
- b. 37°C、400 rpm で 30 分間攪拌しながら反応します。

4. 結合

- a. 100%エタノール 50 μL を加えます。
- b. ピペティング 10 回により混合します。
- c. Bind BBC-イソプロパノール溶液 (Reagent Preparation ステップ 3) 450 μL を加えます。
- d. ピペティング 10 回により混合します。
このとき磁性ビーズは塊を形成します。
- 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 10 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。
- 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。

5. 洗浄

- a. Wash WBD 溶液 (Reagent Preparation ステップ 2) 800 μL を加えます。
- b. ピペティング 10 回により混合します。
溶液は茶色になりますが、磁性ビーズの塊は残ります。

- c. 室温で4分間静置します。
 - d. 反応プレートが磁気プレート上で2分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
 - e. 反応プレートが磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
 - f. 反応プレートが磁気プレートから下ろします。
6. 70%エタノール洗浄
- a. 70%エタノール 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. 反応プレートが磁気プレート上で2分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
 - d. 反応プレートが磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
 - e. 反応プレートが磁気プレートから下ろします。
7. DNase I 処理
- a. ヌクレアーゼフリー水 80 μ L、10 \times DNase I Buffer 10 μ L、DNase I 10 μ L を加えます。
 - b. 室温で1分間反応します。
 - 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。
8. 再結合
- a. Wash WBD 溶液 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。
磁性ビーズの塊は、混合後に無くなります。
 - c. 室温で4分間静置します。
 - d. 反応プレートが磁気プレート上で2分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
 - a. 反応プレートが磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
9. 70%エタノール洗浄
- a. 反応プレートが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. 反応プレートが磁気プレート上で、室温で2分間静置します。
 - c. 反応プレートが磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
 - d. 9.a~9.c のステップを繰り返し行い、ステップ 6 も含めて合計 3 回の 70%エタノール洗浄を行います。
 - e. 反応プレートが磁気プレートから下ろします。
10. 溶出

- a. ヌクレアーゼフリー水 40 μ L を加えます。
- 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

Pseudomonas aeruginosa PA14 株を、250 rpm、37°Cで、LB 培地 1 mL で一晩培養し、OD 8 となりました。RNA 抽出は、これは OD 2, 3, 4 の細胞数にそれぞれ対応する培養液 245, 368, 490 μ L を用いて行いました。本追加プロトコルは、サンプル粘度を抑え、磁性ビーズの磁石への結合に要する時間を短くすることができました。精製 RNA は、350~600 ng/ μ L の濃度で、収量は 15 μ g 以上となりました (Figure 1)。RNA は、260 nm の吸光度から定量しました。A260/A280 値は 1.95 以上でありタンパク質の混入が少なく、また A260/A230 値は 1.70 以上であり多糖類の混入が少ないことを示しています (Table 1)。

Sample	Conc. (ng/ μ L)	A260/A280	A260/A230	total μ g
OD 2	596.1	2.01	2.10	23.8
OD 2	448.2	1.98	1.80	17.9
OD 2	591.3	1.98	1.75	23.7
OD 3	410.5	2.00	1.90	16.4
OD 3	366.1	2.06	2.16	14.6
OD 3	537	2.01	2.00	21.5
OD 4	479.6	1.94	1.84	19.2
OD 4	348.7	2.04	1.75	13.9
OD 4	429.3	1.99	1.72	17.2

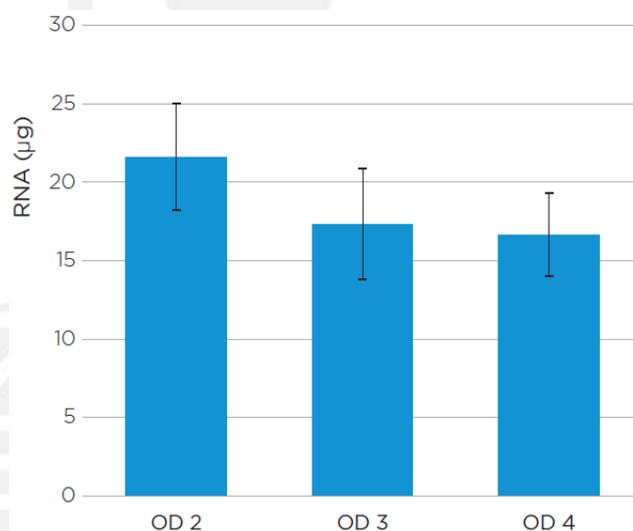


Table 1. 精製 RNA 収量

Figure 1. 様々な *P. aeruginosa* 濃度における精製 RNA 収量。RNA は 260 nm の吸光度により定量。SD, n=3

210217_SP-JP_RNAAdvanceTissue_MuccoidRNA

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>