

細菌核酸濃縮精製キット(5 tests)

細菌検体(1 × 10⁸CFU/ml以下)1mlを煮沸、たんぱく分解後変性剤処理したのち、Silica Column 1000に核酸を吸着させ、遠心機や吸引機を使わず、Syringeだけで洗浄後、40～50ulでカラムから核酸を溶出することで20～25倍に濃縮精製する。1キットで5検体の核酸精製ができ、全工程の所要時間は約12～15分。野外でもできる簡易使用を目指しています。細菌核酸濃縮精製キット(50tests)のトライアルとしても利用いただけます。

	キットに含まれるもの	1回 使用量	備考
Bacteria-BindSol	 Bacteria-BindSol (15ml)x1本	3ml	核酸の結合液
WashSol	 WashSol (20ml)x1本	4ml	カラム洗浄液
5ml EppenTube	 Column 1000 x 5本	1本	核酸吸着用カラム
10ml Feed Syringe / Column1000	 10ml Feed Syringe x 5本	1本	Column1000に装着
DNA stocktube	 ElutSol (500ul) x1本	40～50ul	カラムから核酸を溶出させる
Proteinase K	 Pro K (100ul) x1本	20ul	蛋白分解酵素、4～8℃保存
	 5ml Eppen Tube x5本	1本	検体処理容器
	 DNA Stock Tubes x5本	1個	精製した核酸保存容器 Ringless NA Stock

上記以外に

1. 検体を煮沸、および50～60℃でProteinase K処理するための保温機器
2. 1ml Pipette および20ul Pipette

参考例 野外使用の場合は煮沸器と保温器(50-60℃)が必要



野外用軽量チタン製煮沸カップとバーナー
(キャンプ用品)



AC(100-240V)-DC12V
変圧器



50～60℃保温用
5ml Tubeアルミブ
ロックヒーター

50～60℃でたんぱく処理するための保温機器
(車の12Vの電源を使用して55℃前後で保温)

細菌核酸濃縮精製キット(50tests)

細菌検体(1×10^8 CFU/ml以下)1mlを煮沸、たんぱく分解後変性剤処理したのち、Silica Column 1000に核酸を吸着させ、遠心機や吸引機を使わず、Syringeだけで洗浄後、40～50ulでカラムから核酸を溶出することで20～25倍に濃縮精製する。1キットで50検体の核酸精製ができ、全工程の所要時間は約12-15分。

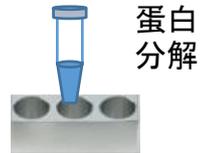
		キットに含まれる製品	1回使用量	備考
Bacteria-BindSol		Bacteria-BindSol (150ml) 1bottle	3ml	納入後、特級ethanol100mlを添加し、working Bacteria-BindSol 150ml とする。検体と混合し核酸をカラムに結合させる液。
WashSol		WashSol (200ml)1bottle	4ml	納入後、特級ethanolを160ml加えて Working WashSolとする。カラムを洗浄する液
ProkSol		ProkSol(1ml) 1bottle	20ul	検体の蛋白分解 長期保存には4-8℃
ElutSol		ElutSol (2.5ml) 1bottle	40～50ul	4℃で保存。核酸をカラムから溶出させる。
Silica Column		SilicaColumn1000 (50本)	1本	核酸吸着用カラム
10ml Feed-Syringe		購入が必要な個別販売品	1回使用量	備考
		10ml Feed Syringe (100本/箱)	1本	カラムに装着して使用
5ml Tube		5ml Eppen Tube (250本/箱)	1本	検体の加熱処理に使用

細菌核酸濃縮精製キット操作手順

1. 5ml Eppen Tube に検体 1ml を入れ、100°C で 3 分間煮沸する。
2. ProKSol 20ul を添加し、50-60°C で 3 分間かけてたんぱくを消化したのち、Bacteria-BindSol を 3ml 追加し混合する。
(5ml Tube の 4ml の目盛りまで滴下もしくは screw cap をはずし 1ml の Pipette で分注)
3. 10ml Feed Syringe に Column1000 を装着し、Step2 の混合液全量を Silica 面の上まで吸い上げたのち、全量をゆっくりと押し出し Silica に核酸を吸着させる。吐出液は廃棄する。
* カラムの先端から水滴が独立して落ちる程度の力で押し出す。水滴が連結で出るような強い力で押し出すと核酸のカラムへの結合率が悪くなる。



煮沸



蛋白分解

4. WashSol 4ml を BindSol が入っていた空の Tube の 4ml の目盛りまでに滴下する（もしくは Screwcap をはずして Pipette で入れる）。WashSol 4ml を全量吸い上げ、強く吐出してカラムを洗浄する。押し出した洗浄液は廃棄する。
5. シリンジ内に 10ml の空気を取り込み、強く押し出す。この工程を 5-10 回繰り返し、カラムに付着した洗浄液を押し出し乾燥させる。



吸着



6. ElutSol 40~50ul を空の DNA 回収用の Tube に移す。シリンジに装着されたカラムの先端を Tissue でふき取り、シリンジで ElutSol をカラムの Silica 面の上まで、バブルをつくらないようにゆっくりと吸い上げる。Silica から核酸が遊離するまで約 2 分待ったあと、DNA 回収 Tube に核酸が溶出した液を押し出す。
* 核酸の回収率が低い場合、押し出した EluteSol を再度吸引し押し出す操作を繰り返すと回収率が上がる可能性がある。



洗浄



核酸のカラムへの吸着率は多糖体、脂質、界面活性剤等に影響を受ける。細胞壁成分などの不純物が多い細菌破砕液からより多くの不純物を取り除くようにデザインされた新しい Bacteria-BindSol は従来の BindSol より細菌破壊液の核酸の回収率が高くなっている。煮沸後に Proteinase K を加えても検体の濁度が低下しない場合は Beads 法の実施を推奨する。



溶出

実施例

E.colioli GTC503 株の菌液 1.2×10^9 cfu/ml の菌液 1ml を検体として上記の手順で処理した。大腸菌の菌液の濁度は ProK 処理のみ、および加熱処理と ProK 処理のいずれも添加後に急激に低下し、溶菌が起きていることが確認できた。カラムを通過前と通過後の DNA の蛍光強度は Invitrogen 社の Qubit 1xDouble Stranded DNA HS Assay kit を使用して測定し、蛍光の減少率から吸着率を計算した。

	E.coliGTC503株 1.2×10^9 cfu/ml	
処理方法	Boil + ProK 処理	ProK 処理のみ
カラム吸着率	84~90%	70~81%

難分解性 Legionella の菌液の濁度は煮沸処理、および ProKSol 添加後も減少しなかったため十分な溶菌ができていなかったと判断した。しかし Beads 処理をくわえることで吸着率は 10% ほど上昇した。多糖体や脂質が多く十分な回収率が得られない菌種の場合はビーズ法で破碎した後、従来の強力なフェノール-クロロホルム処理・エタノール沈殿したあとカラム処理すれば純度の高い核酸が得られる

	L. pneumophilla GTC745株 1.0×10^9 cfu/ml	
処理方法	Boil + Beads + ProK 処理	Boil + ProK 処理
ProK 処理後の濁度	低下	変化なし
カラム吸着率	37~47%	26~33%