

難分解性細菌核酸精製キット (5tests)

ジルコニアビーズ法を使って煮沸法で分解しにくい細菌や高濃度細菌懸濁液(5×10^9 cfu/ml未満)200ul から菌体を破碎し、遠心機や吸引器を使わず、SyringeとSilica Columnで核酸を抽出精製するキットです。約15分で抽出精製が完了します。難分解性細菌核酸精製キット(50tests)のお試しキットとしてお使いください。 5×10^9 cfu/ml以上の菌液を使用すると、カラムの目詰まりがおきてSyringeを使った精製が難しくなりますのでご注意ください。

	キットに含まれるもの	1回 使用量	備考
EZ-Beads 	EZ-Beads (5tubes)	1本	細菌破碎用のジルコニアビーズが入ったTubes
Bacteria-BindSol 	Bacteria-BindSol (15ml) 1本	3ml	細菌吸着に最適化したSilica-Column1000専用の結合液
WashSol 	WashSol (20ml)1本	4ml	結合液、脂質、多糖体をカラムから洗い流す洗浄液
Feed Syringe/ Column 1000 	10ml Feed Syringe 5本	1本	核酸を吸着させるためのチップカラムで Feed Syringeに装着して使用(1mlのPipetteにも装着できる)
5ml EppenTube 	ElutSol(500ul) 1本	40~ 50ul	カラムから核酸を溶出させる
Elute DNA tube 	5ml Eppen Tube 5本	1本	検体処理容器
Proteinase K 	DNA Stock Tube 5本	1本	カラムから溶出した核酸の保存容器
5ml Heat block heater(50-60°C) 	ProKSol(100ul) 1本	20ul	蛋白分解酵素、4~8°C保存し、50-60°Cで使用

その他必要なもの:

① 5ml Eppen tube用のHeatblock (50~60°C)

② ジルコニアビーズでの細胞破碎機はDisruptor Genie (M&S Instrument社)を使用。あるいは、Vortex Mixer(破碎力は弱い)。

難分解細菌や菌類の破碎により強力なBeads shakerが必要な場合はM&S社や安井機器のBeads Shakerをお試しください。その際は、Beads入り容器が破損することがあるのでBeads容器を専用のものに入れ替える必要があります。



DisruptoGenie

難分解性細菌核酸精製キット (50tests)

ジルコニアビーズ法を使って、煮沸法では分解しにくい細菌検体液や高濃度細菌懸濁液(5x10⁹cfu/ml未満)200ul から菌体を破碎し、遠心機や吸引器を使わず、SyringeとSilica Columnで核酸を抽出精製するキットです。約15分で抽出精製が完了します。まずは5テストだけの難分解性細菌核酸精製キット(5tests)でお試ください。5x10⁹cfu/ml以上の菌液を使用するとカラムの目詰まりがおきてSyringeを使った精製が難しくなりますのでご注意ください。

キット(50tests)に含まれる標準品目

EZ beads 1箱(50本)		EZ-Beads 1箱 (50本)	細菌を壊すための ジルコニアビーズ入りの tubes
ProkSol		ProKSol(1ml) 1本	破壊した菌液のたんぱくを 分解するProteinaseK液 (20ul/回)
Bacteria- BindSol (150ml)		Bacteria-BindSol(150ml) 1本	難分解細菌をBeadsで分解 後、Silica Columnに結合さ せるために最適化した結 合液(3ml/回)
WashSol (200ml)		WashSol(200ml) 1本	カラムに付着した結合液、 多糖体、脂質を洗浄するた めの試薬(4ml/回)
ElutSol (2.5ml)		ElutSol(2.5ml) 1本	カラムに吸着した核酸を溶 出させる試薬(40~50ul/ 回)
Silica Column 1000		Silica Column1000 (50本)	核酸を吸着させるための Silica Column。Feed Syringeを装着させて使用。 1ml Pipettelにも装着できる。

別途購入が必要な品目

Feed Syringe 10ml		10ml Feed Syringe (100本/1箱)	Silica Column 1000を 装着して核酸を精製す るために使用
EppenTube 5ml		5ml EppenTube (250本/1箱)	検体処理の工程で使用 する。

その他必要なもの:

- ① 5ml Eppen tube用のHeatblock heater(50~60°C)
- ② ジルコニアビーズでの細胞破碎機はDisruptor Genie(M&S Instrument社)を使用。あるいは、Vortex Mixer(破碎力は弱い)。

難分解細菌や菌類の破碎により強力なBeads shakerが必要な場合はM&S社や安井機器のBeads Shakerをお試ください。その際は、Beads入り容器が破損することがあるのでBeads容器を専用のものに入れ替える必要があります。



難分解細菌核酸精製手順

1. 菌液 (5×10^9 cfu/ml未満) 200ulをBeads入りtubeにいれ、100℃で3分間煮沸する。その後、1~2分間Disruptor Genieで攪拌して菌体を破碎する。
2. 1mlの生食塩水をチューブに加え攪拌後、1mlを5mlEppenTubeに移し、ProKSol 20ulを添加し、50~60℃で3分間かけてたんぱくを消化。その後、Bacteria-BindSolをTubeの4mlのメモリまで3ml追加する。
3. 10ml Feed SyringeにColumn1000を装着し、Step2の混合液4mlを全量カラムのSilica面の上まで吸い上げ、次に全量をゆっくりと押し出してカラムの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。強く押し出し、水滴が連結して出るような強い力で押し出すと核酸のカラムへの結合効率が悪くなる。
4. WashSol 4mlをEppentubeに加え、全量を吸い上げたのち、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. Feed Syringe内に10mlの空気を取り込み、強く押し出す。この工程を5-10回連続して繰り返し、カラムに付着した洗浄液を押し出してカラムを乾燥させる。
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分待つ。
7. ElutSolを押し出して核酸を添付の容器に回収する。回収率が悪い場合は吸引・吐出を数回繰り返すと回収率が上がることがある。



菌体破碎



たんぱく分碎



核酸吸着



洗浄



核酸溶出

細菌の処理液をカラムへ吸着させるには溶菌を確実にを行い、さらに 細胞壁成分などの不純物を取り除く必要がある。煮沸とProKSolで十分な溶菌ができない場合は、物理的に細胞壁を破碎する本法(ジルコニアビーズ法)が適している。

実施例

難分解性の*Legionella pneumophila* GTC745株 (5×10^9 cfu/ml) 200ulをBoil 法とBeads法で破碎し、タンパク処理したあとに蒸留水で1mlに増量し、3mlのBindSolを添加した。カラムを通過前後の液の蛍光強度を測定して蛍光強度の減少率を比較した。核酸濃度はdouble Stranded DNA HSキット(Invitrogen社)とQubid4を使用して計測した。

<i>L.pneumophila</i> GTC745 処理法	ProK処理のみ	煮沸/ProK処理	煮沸/Beads/ProK処理
ProK処理後の検体液濁度の変化	変化なし	変化なし	減少
カラム通過後の蛍光量	67~73%	64 ~70%	53~61%
カラム吸着率	27~33%	30~36%	39~47%

一方、分解しやすい*Escherichia coli* GTC503株はビーズ処理や、加熱処理しなくても、ProteinaseK処理だけで約8割の核酸がカラムに吸着した。

<i>E. coli</i> GTC503 菌液処理法	ProK処理のみ	煮沸/ProK処理	煮沸/Beads/ProK処理
ProK処理後の検体液濁度の変化	透明化	透明化	透明化
カラム通過後の蛍光量	19-24%	10~16%	8~13%
カラム吸着率	76~81%	84~90%	87~92%

*ビーズ破碎にはM&S instrument社のDisruptor Genieを使用した。

