Agencourt 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

96 ウェル 1.2 mL ディープウェルプレート

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/µL)、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、PK Buffer を 50 preps の場合は 1.2 mL、96 preps の場合は 2.3 mL、384 preps の場合は 8.4 mL 加え、混合します。調製後の溶液は、-20℃で保存します。

2. Wash Buffer 溶液を調製します。

   Wash Buffer のボトルに、100%イソプロパノールを 50 preps の場合は 40 ml、96 preps の場合は 62 ml、384 preps の場合は 250 mL 加え、混合します (Wash Buffer と 100%イソプロパノールを、3 : 2 の割合で混合)。調製後の溶液は、室温で保存します。

3. Bind-イソプロパノール溶液を用時調製します。

   1 サンプルあたり、Bind-イソプロパノール溶液が 450 µL 必要です。Bind Buffer 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 Buffer 90 µL に 100%イソプロパノールを 360 µL 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 ×*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 ×*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 Buffer 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℃、400 rpm で 30 分間撹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. ピペッティング 10 回により混合します。
   c. Bind-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. ピペッティング 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 Buffer 溶液 (Reagent Preparation ステップ 2) 800 µL を加えます。
   b. ピペッティング 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。

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。

6. 70%エタノール洗浄

a. 70%エタノール 800 µL を加えます。

b. ピペッティング 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 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。

7. DNase I 処理

a. ヌクレアーゼフリー水 80 µL、10× DNase I Buffer 10µL、DNase I 10 µL を加えます。

b. 常温で 1 分間反応します。

c. ピペッティング 10 回により混合します。

d. 37℃で 15 分間反応します。

8. 再結合

a. Wash Buffer 溶液 550 µL を加えます。

b. ピペッティング 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。

a. 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。

9. 70%エタノール洗浄

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 µL を加えます。

b. 反応プレートを磁気プレート上で、室温で 2 分間静置します。

c. 反応プレートを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. 反応プレートを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 µL 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℃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 µL 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/µL の濃度で、収量は 15 µg 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/µL)	A260/A280	A260/A230	total µg
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

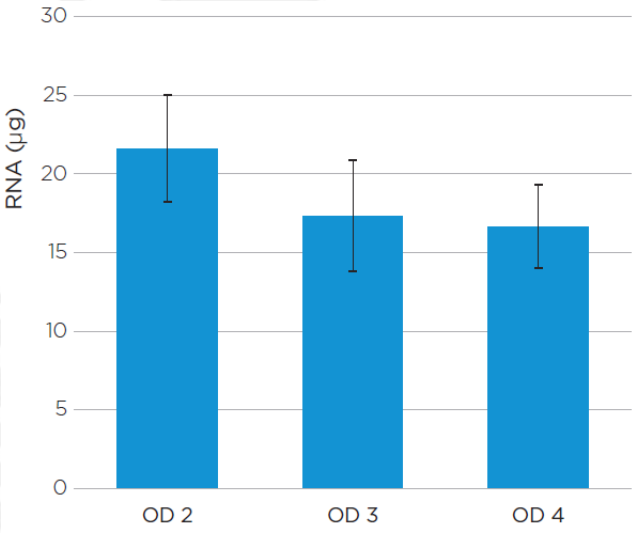

Table 1. 精製 RNA 収量

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

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　FAX 03-5530-2460
e-mail bckkcas@beckman.com　URL http://www.beckmancoulter.co.jp