

*prepGEM*TM Bacteria Kit 簡易マニュアル

2020/09/28 作成

エムエス機器株式会社

以下は MicroGEM 社の公式 Website (<https://microgembio.com/>) からダウンロードできる Quick-Start Guide (QSG) や Ordering Information & Product Guide や公式 Website の記述など、複数の情報源から作成した簡易マニュアルです。必要に応じアレンジしていただけたら幸いです。なお、簡易マニュアルのもととなった QSG の版は “QSG_002_190531_prepGEM Bacteria” です。

<用途>

prepGEM Bacteria Kit はさまざまな菌から DNA を抽出するためのキットです。

<内容物>

prepGEM Bacteria Kit の内容物は以下のとおりです。

- *prepGEM*
- Lysozyme
- 10x GREEN+ Buffer
- Enhancer
- 5x WASH+ Buffer

<溶解>

上記内容物のうち Lysozyme だけは凍結乾燥粉末で届きます。到着後は Lysozyme 粉末が入ったチューブを 10,000g × 1 分でスピンドウンし、チューブに記載された液量の 100 mM Tris-HCl (pH8.0) で溶解してください。

<保管>

prepGEM Bacteria Kit は安定ゆえ室温配送されますが、到着後の未開封キットは 4℃で保管してください。チューブ開封後の *prepGEM* や溶解後の Lysozyme は念のため小分けにして -20℃で保管してください。DNA-free 水で 1x に希釈した WASH+ Buffer は室温保管できますが長期の場合は 4℃保管をお勧めします。

Bacterial method overview (菌からの DNA 抽出の概略)

	十分量の 水に懸濁	WASH+ バッファー に懸濁	遠心	上清の 除去	リゾチ ームの 添加	抽出液 ミクス チャー への懸 濁	37 ℃	75 ℃	95 ℃
莢膜をもつ菌							10	10	2
バイオフィルム							10	10	2
粘膜スワブ							10	10	2
スワブ表面							10	10	2
グラム陽性菌							10	10	2
グラム陰性菌								5	2
マイコプラズマ								5	2

Colonies and Biofilms (コロニー・バイオフィルム)

<阻害物質除去>

WASH+ Buffer にはサンプル中のポリサッカライドやポリフェノールによる反応阻害を低減する役割があります。以下のような場合、**WASH+** Buffer で pre-wash することをお勧めします。

- 多量のポリサッカライドを産生する菌
- 莢膜をもつ菌
- 粘液中のサンプル（例：喀痰、咽頭スワブ、膣スワブ）
- 土壌や糞便からタンニン、フミン酸、ポリサッカライド等の反応阻害物質の除去

<コロニー・バイオフィルム>

コロニーは抽出液ミクスチャーヘダイレクトに懸濁することができます。そのとき過剰量のコロニーをピックアップしないようご注意ください。バイオフィルムや多量のポリサッカライドを産生する菌の場合は **WASH+** Buffer での pre-wash をお勧めします。

1. 1.5 mL マイクロチューブに 400 μ L の 1x **WASH+** Buffer を分注します。
2. 少量（2 mm² まで）のコロニーやバイオフィルムをマイクロピペットチップ等で掻きとり **WASH+** Buffer に懸濁します。
3. ボルテックスミキサーで菌をよく懸濁します。
4. >10,000 r.c.f x 5 分で遠心します。
5. 上清を完全に取り除きます。
6. 菌のペレットを抽出液ミクスチャー（次々ページ参照）に懸濁します。

Liquid Cultures, Sputum and Swabs (カルチャー、喀痰、スワブ)

<カルチャー・喀痰>

どれぐらいのカルチャー液量をスタート材料にすればよいかはカルチャーの菌濃度によります。通常だと 20 μL の Log-phase カルチャーを用いるとよい結果が得られますが、最適化が必要となるかもしれません。

1. 1.5 mL マイクロチューブに Log-phase カルチャーを 20 μL または喀痰を 20-100 μL 分注します。
2. 400 μL の 1x WASH+ Buffer を添加します。
3. ボルテックスミキサーで菌をよく懸濁します。
4. >10,000 r.c.f x 5 分で遠心します。
5. 上清を完全に取り除きます。
6. 菌のペレットを抽出液ミクスチャー（次ページ参照）に懸濁します。

<スワブ>

1. 1.5 mL マイクロチューブに 400 μL の 1x WASH+ Buffer を分注し、スワブを 30 秒浸し、マイクロチューブの内壁にスワブをこすりつけるようにしてできるだけ液体を絞り出します。
2. ボルテックスミキサーで菌をよく懸濁します。
3. >10,000 r.c.f x 5 分で遠心します。
4. 上清を完全に取り除きます。
5. 菌のペレットを抽出液ミクスチャー（次ページ参照）に懸濁します。

Extraction (抽出)

<抽出液ミクスチャー>

1. 抽出液ミクスチャーを以下のように作ります。

88 μ L	DNA-free 水
10 μ L	10x GREEN+ Buffer
1 μ L	<i>prep</i> GEM
1 μ L	Lysozyme (グラム陰性菌の場合は省略可)

2. サーマルサイクラーで以下のように熱処理を行います。

37 $^{\circ}$ C	15 分 (グラム陰性菌の場合は省略可)
75 $^{\circ}$ C	10 分
95 $^{\circ}$ C	2 分

これでサンプルは解析準備が整いました。

Soil and Stool (土壌・糞便)

土壌サンプルからの DNA 抽出はフミン酸の遊離があるため容易ではありません。下記の方法ではバッファ一中で固形物を差次的沈殿させます。

<差次的沈殿>

1. 1.5 mL マイクロチューブに 50 mg までの土壌・糞便を取ります。
2. 500 μ L の 1x WASH+ Buffer に懸濁します。
3. ボルテックスミキサーに 1 分かけて菌をよく懸濁します。
4. 200 r.c.f x 30 秒で遠心します。
5. 上清を別の新しい 1.5 mL マイクロチューブに移しとります。
6. 最高速で 2 分で遠心します。
7. WASH+ Buffer を注意深く取り除きます。
8. ペレットを 100 μ L の水に懸濁します。

<抽出>

1. 抽出液ミクスチャーを以下のように作ります。

78 μ L	DNA-free 水
10 μ L	10x GREEN+ Buffer
10 μ L	Enhancer
1 μ L	prepGEM
1 μ L	Lysozyme
50 μ L	菌の懸濁液

2. サーマルサイクラーで以下のように熱処理を行います。

37 $^{\circ}$ C	15 分
75 $^{\circ}$ C	10 分
95 $^{\circ}$ C	2 分

3. 最高速で 2 分で遠心し上清を別の新しいチューブに移しとります。

DNA は移しとった上清中にあります。PCR や qPCR には 1 μ L 以下をテンプレートとして用います。

Rapid plasmid prep from *E. coli* (大腸菌からの迅速プラスミド抽出)

1. OD₆₀₀ が約 1-1.5 となるまでオーバーナイトカルチャーします。
2. 200 μ L のカルチャーを PCR チューブに移します。
3. 最高速で 2 分で遠心し上清を完全に取り除きます。

コロニーの場合は、直径約 4mm のものを掻きとり下記の抽出液ミクスチャーに添加します。

<抽出>

1. 抽出液ミクスチャーを以下のように作り菌ペレットを懸濁します。

5 μ L	10x GREEN+ Buffer
44 μ L	DNA-free 水
1 μ L	<i>prepGEM</i>

2. サーマルサイクラーで以下のように熱処理を行います。

75 $^{\circ}$ C	5 分
99 $^{\circ}$ C	5 分
4 $^{\circ}$ C	2 分

3. 20,000 r.c.f x 5 分で遠心します。

4. ペレットを廃棄します。プラスミドは上清中にあります。

Technical Tips (技術情報)

- *prepGEM* は DNA を抽出するためのキットです。このキットは細胞を溶解し DNA から核タンパク質を除去します。抽出された DNA はさまざまなジェノタイピング (SNP 解析、STR 解析など) や定量 PCR、マルチプレックス PCR、エンドポイント PCR 等に用いることが可能です。
- *prepGEM* のプロトコルには濃縮ステップがありません。それゆえ最終抽出物の DNA 濃度は 1) サンプルの質 2) スワブの場合はスワブサイズや溶出に使った液量 3) サーマルサイクラーにかけた際の液量 に依存します。
- *prepGEM* で抽出された DNA は 95°C 数分のステップのために多くがシングルストランド形状となっています。
- *prepGEM* で抽出された DNA を正確に定量するには qPCR を奨励します。あるいは PicoGreen, iQuant, Qubit 等の蛍光色素法で定量することも可能です。OD₂₆₀ 測定による定量は適していません。
- DNA 抽出前や抽出後はサンプルを 4°C あるいは氷上で扱うことを奨励します。
- 抽出された DNA を保存する場合は 1/10 容量の 10x TE Buffer を添加して -20°C 以下で保存します。