

mericon™ DNA Bacteria プロトコールとトラブルシューティング

mericon DNA Bacteria Kit

mericon DNA Bacteria Plus Kit

グラム陰性菌およびグラム陽性菌からの DNA 抽出

目次	ページ
プロトコール	
<i>mericon</i> DNA Bacteria Kit を用いて食品中の病原体 DNA 精製	2
<i>mericon</i> DNA Bacteria Plus Kit を用いて食品中の病原体 DNA 精製	4
トラブルシューティング	6



プロトコール：mericon DNA Bacteria Kit を用いて食品中の病原体 DNA 精製

このプロトコールは、病原体の増菌培養液からグラム陰性菌の全ゲノム DNA 抽出用にデザインされています。

実験前の注意事項

- 感染性病原体（サルモネラなど）を取り扱う場合は、本プロトコールでの実験操作と続く検体解析（PCR など）を感染性細菌の作業用に指定された適切な研究領域で実施する必要があります。検体は、国内法およびガイドラインに準拠して取り扱う必要があります。
- 検体は溶解後も感染性物質を含んでいる可能性があります。従って操作中の検体は感染性があるものとして取り扱ってください。DNA 溶液中の生菌の存在をテストするには、プロトコールのステップ9を参照してください。

実験開始前の準備事項

- ステップ6に使用するサーモミキサーまたはヒートブロックを 100℃ に加熱しておきます。

操作手順

1. ホモジナイズ用バッグに食品検体 25 g を入れ、225 ml の増菌培地を添加する。
注：微生物検査用食品検体を食品検査として使用する場合は、国内法およびガイドラインに従って細菌に指定された増菌培地をご利用ください。
2. 食品検体をパドルブレンダーでホモジナイズする (230 rpm で 1.5 分間)。細菌に適した温度と時間でホモジネートをインキュベートする。
注：微生物検査用食品検体を食品検査として使用する場合は、国内法およびガイドラインに従って細菌に指定されたインキュベーション温度と時間をご利用ください。
3. 適切なインキュベーションの後、1 ml の増菌培養液を 2 ml のスクリュウキャップマイクロ遠心チューブ（別途準備）に入れて、13,000 x g で 5 分間遠心操作する。
4. ペレットが剥がれないように注意して、上清をピペットで取り除く。
5. 200 µl の Fast Lysis Buffer を細菌ペレットに加え、蓋を固く閉め、短時間で激しくボルテックスしてペレットを再懸濁する。

注：増菌培地が残留していると細菌ペレットが強く着色することがあります。少量の着色した増菌培地が DNA 溶液に混入すると、PCR 反応中の蛍光検出に影響します。この場合、13,000 x g で 5 分間遠心操作後に 500 µl の Fast Lysis Buffer でペレットを再懸濁するステップを少なくとも 2 回繰り返して細菌ペレットを洗浄します。細菌懸濁液が無色になるまで洗浄を繰り返します。

6. マイクロ遠心チューブを、100℃に設定したヒートブロックあるいはサーマルシェーカー（800 rpm）にセットする。検体を 10 分間加熱する。
7. 検体を取り出し、室温（15～25℃）まで冷まして 2 分間インキュベートする。
8. チューブを 13,000 x g で 5 分間遠心操作する。
9. 100 μ l の上清を新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブに入れる。回収した上清の一部を直接 PCR 反応に使用する。無菌性テストを行なわない場合は、残りの上清を棄てる。

注：上清は 2～8℃で 1 週間、-20℃で 3 週間保存できます。

注：DNA 溶液中の無菌性テストを行なう場合は、残りの上清から 20 μ l の DNA 溶液をそれぞれの病原体に適切な寒天培地に塗布します（増菌培養と同じ時間と温度を使用）。寒天培地での細菌培養は、この溶液に存在する可能性がある低濃度の阻害物質で阻害されることはありません。

プロトコール：mericon DNA Bacteria Plus Kit を用いて 食品中の病原体 DNA 精製

このプロトコールは、病原体の増菌培養液中のグラム陽性菌あるいは溶解困難なその他の病原体から全ゲノム DNA を抽出するためにデザインされています。

実験前の注意事項

- 感染性病原体（サルモネラなど）を取り扱う場合は、本プロトコールでの実験操作と続く検体解析（PCR など）を感染性細菌の作業用に指定された適切な研究領域で実施する必要があります。検体は、国内法およびガイドラインに準拠して取り扱う必要があります。
- 検体は溶解後も感染性物質を含んでいる可能性があります。従って操作中の検体は感染性があるものとして取り扱ってください。DNA 溶液中の生菌の存在をテストするには、プロトコールのステップ 8 を参照してください。

操作手順

1. ホモジナイズ用バッグに食品検体 25 g を入れ、225 ml の増菌培地を添加する。
注：微生物検査用食品検体を食品検査として使用する場合は、国内法およびガイドラインに従って細菌に指定された増菌培地をご利用ください。
2. 食品検体をパドルブレンダーでホモジナイズする (230 rpm で 1.5 分間)。細菌に適した温度と時間でホモジネートをインキュベートする。
注：微生物検査用食品検体を食品検査として使用する場合は、国内法およびガイドラインに従って細菌に指定されたインキュベーション温度と時間をご利用ください。
3. 適切なインキュベーションの後、1 ml の増菌培養液を 2 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に入れて、13,000 x g で 5 分間遠心操作する。
4. ペレットが剥がれないように注意して、上清をピペットで取り除く。
5. 400 μ l の Fast Lysis Buffer を細菌ペレットに加え、蓋を固く閉め、短時間で激しくボルテックスしてペレットを再懸濁する。
注：増菌培地が残留していると細菌ペレットが強く着色することがあります。少量の着色した増菌培地が DNA 溶液に混入すると、PCR 反応中の蛍光検出に影響します。この場合、13,000 x g で 5 分間遠心操作後に 500 μ l の Fast Lysis Buffer でペレットを再懸濁するステップを少なくとも 2 回繰り返して細菌ペレットを洗浄します。細菌懸濁液が無色になるまで洗浄を繰り返します。
6. 全溶液を Pathogen Lysis Tube（付属）に移す。チューブの蓋を固く閉めて、ボルテックスアダプターに水平あるいは垂直に固定し、最高スピードで 10 分間ボルテックスする。

7. チューブを $13,000 \times g$ で 5 分間遠心操作する。
8. $100 \mu\text{l}$ の上清を新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブに入れる。回収した上清の一部を直接 PCR 反応に使用する。無菌性テストを行なわない場合は、残りの上清を棄てる。

注：上清は $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ で 1 週間、 -20°C で 3 週間保存できます。

注：DNA 溶液中の無菌性テストを行なう場合は、残りの上清から $20 \mu\text{l}$ の DNA 溶液をそれぞれの病原体に適切な寒天培地に塗布します（増菌培養と同じ時間と温度を使用）。寒天培地での細菌培養は、この溶液に存在する可能性がある低濃度の阻害物質で阻害されることはありません。

トラブルシューティング

コメント

細菌のペレット化の後、上清表面に薄い層を形成

増菌培養液から 食品成分（脂肪など） が混入した	上清を除去する際にこの層が細胞ペレットに付着しないように注意する。上清を除去する前にこの層を取り除く。
--------------------------------	---

mericon DNA Bacteria あるいは **mericon DNA Bacteria Plus** プロトコールのステップ 5 で、**Fast Lysis Buffer** を添加後に細菌懸濁液が着色

- a) 細菌ペレットに食品残渣が混入
- 13,000 × g で 5 分間の遠心操作と着色したペレットを 500 μl の Fast Lysis Buffer で再懸濁する操作を、少なくとも 2 回あるいは細菌ペレットが無色になるまで繰り返して、細菌ペレットを洗浄する。*mericon DNA Bacteria* あるいは *mericon DNA Bacteria Plus* プロトコールのステップ 5 で上清を除去し、洗浄したペレットをアプライする。
- b) 細菌ペレットに増菌培地が混入
- 13,000 × g で 5 分間の遠心操作と着色したペレットを 500 μl の Fast Lysis Buffer で再懸濁する操作を、少なくとも 2 回あるいは細菌ペレットが無色になるまで繰り返して、細菌ペレットを洗浄する。*mericon DNA Bacteria* あるいは *mericon DNA Bacteria Plus* プロトコールのステップ 5 で上清を除去し、洗浄したペレットをアプライする。

DNA 収量が低い

溶解および破砕が不完全	加熱（ <i>mericon DNA Bacteria</i> プロトコールのステップ 6）あるいは機械（ <i>mericon DNA Bacteria Plus</i> プロトコールのステップ 6）による 2 度目の溶解をさらに 5 分間行なって、細菌を完全に溶解する。
-------------	---

コメント

DNA を用いたダウンストリーム実験で良い結果がでない

- a) 食品由来の阻害物質が検体を 1 : 10 以上に希釈し、PCR 解析を行なう。
検体調製中に混入
 - b) 解析用検体が古い
あるいは DNA 保存が不適切
- DNA 調製後ダウンストリーム実験で直接使用することを推奨。必要に応じて DNA 溶液を 2 ~ 8℃で最高 1 週間、-20℃で最高 3 週間保存する。この期間を超えると DNA は分解を始める。

Trademarks: QIAGEN®, *mericon*™ (QIAGEN Group).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載の QIAGEN 製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2010–2011 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒 104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel: 03-6890-7300 ■ Fax: 03-5547-0818 ■ E-mail: techservice-jp@qiagen.com

