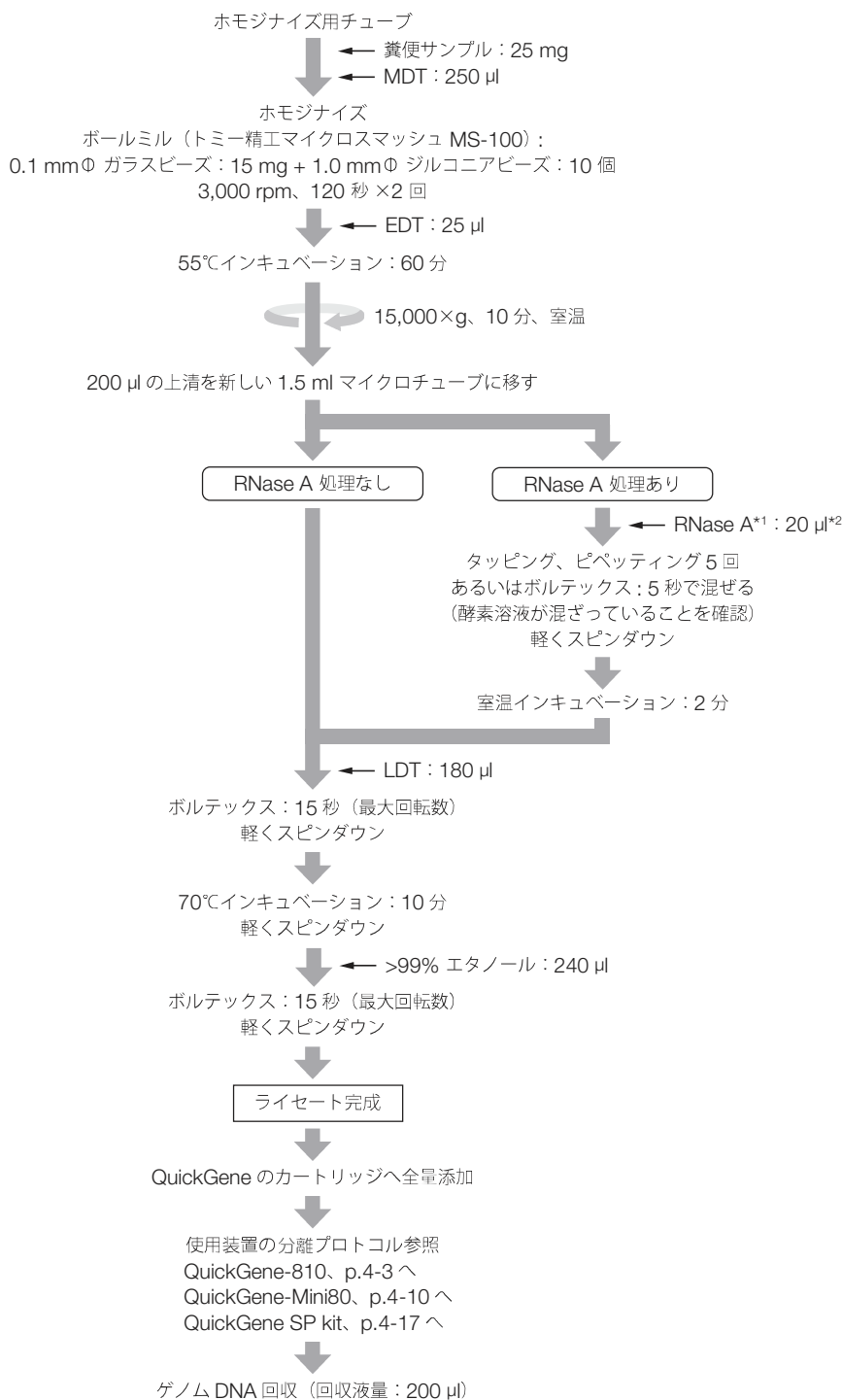


3-VII 章

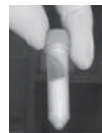
細菌からのゲノム・プラスミド DNA分離

糞便からの細菌ゲノムDNA分離

プロトコル



サンプル秤量後



ホモジナイズ後



遠心後

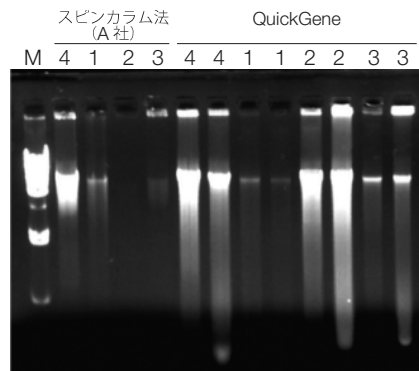
*1 RNase A は、キットに含まれておりません。推奨 RNase（以下を参照）を御用ください。

*2 RNase A（invitrogen Cat. No.12091）の場合は 60 µl。

結果

糞便サンプル No.1：成人 1 No.2：成人 2
No.3：乳児 1 No.4：ラット 1

電気泳動図



電気泳動条件：0.8% アガロース

M： λ -Hind III
1：No.1 成人 1
2：No.2 成人 2
3：No.3 乳児 1
4：No.4 ラット 1

(+)：RNase 処理あり、(-)：RNase 処理なし
分離したゲノム DNA に分解は認められなかった。

ゲノム DNA の収量

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	8.4 μ g	23.7 μ g	15.8 μ g	34.4 μ g
スピнкаラム法 (A社)	2.3 μ g	0.6 μ g	N.D	6.7 μ g

タンパク質の混入：A260/280

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	2.14	1.92	2.08	2.13
スピнкаラム法 (A社)	2.08	1.36	N.D	1.70

カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

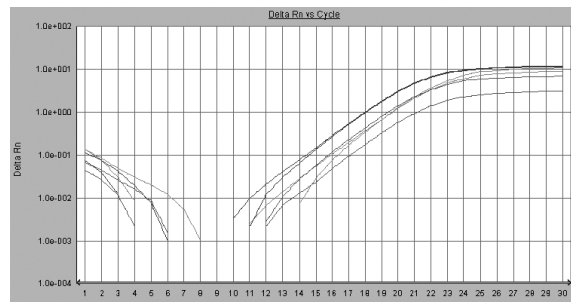
その他

リアルタイム PCR

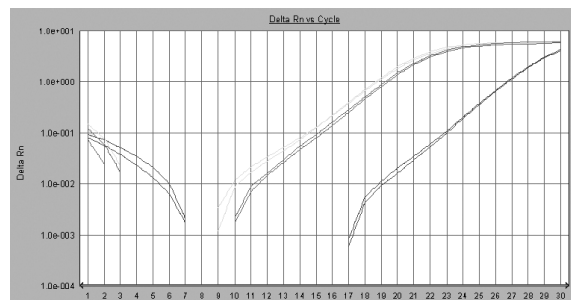
QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A社) を用いて糞便から分離したゲノム DNA で、大腸菌群特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR を行った。

テンプレートとして 1 μ l の溶出液を使用した (総反応容量 10 μ l：デュプリケート)。

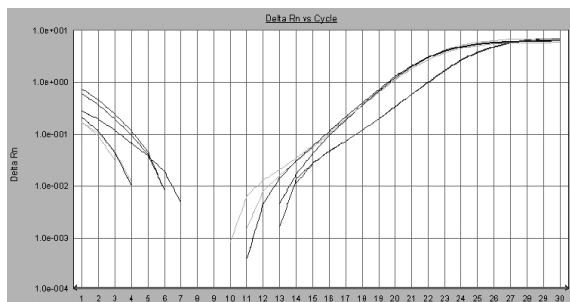
リアルタイム PCR には Applied Biosystem 7300 を使用した。



青：成人 1 (QuickGene-810、RNase 処理あり)
緑：成人 1 (QuickGene-810、RNase 処理なし)
橙：成人 1 (スピнкаラム法 (A社)、RNase 処理なし)



黄：成人 2 (QuickGene-810、DNase 処理あり)
青：成人 2 (QuickGene-810、DNase 処理なし)
緑：成人 2 (スピнкаラム法 (A社)、RNase 処理なし)



紺：乳児 1 (QuickGene-810、RNase 処理あり)
 青：乳児 1 (QuickGene-810、RNase 処理なし)
 茶：乳児 1 (スピカラム法 (A 社)、RNase 処理なし)



緑：ラット 1 (QuickGene-810、RNase 処理あり)
 桃：ラット 1 (QuickGene-810、RNase 処理なし)
 赤：ラット 1 (スピカラム法 (A 社)、RNase 処理なし)

いずれのゲノム DNA でも、リアルタイム PCR で発現解析を行うことができた。

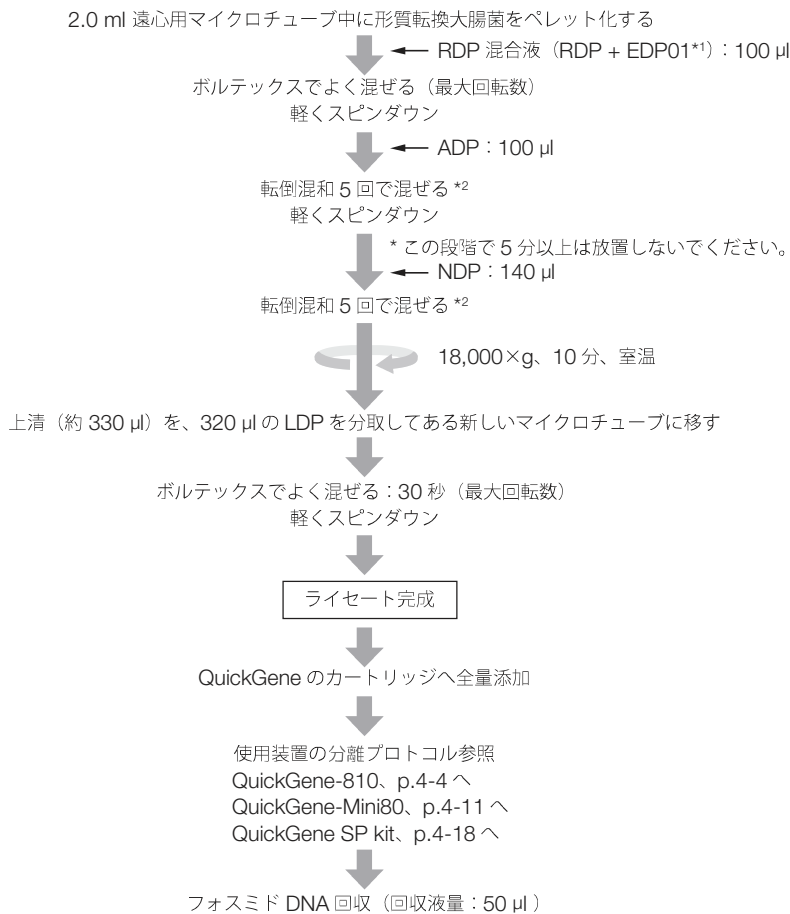
その他、乳酸菌 (Lactobacillus) 属特異的プライマーや Clostridium coccoides-Eubacterium rectale グループ 特異的プライマーでも同様に発現解析を行うことができた。

共通プロトコルサンプル

データなし

大腸菌からの Fosmid DNA 分離

プロトコル



*1 EDP-01 全量を RDP ボトルに添加。

*2 ADP または NDP 添加直後、チューブを転倒して混ぜてください。溶液は、チューブを穏やかに 5 回転倒することで混ぜなければなりません。溶液をボルテックスすると、染色体 DNA が分離されます。もしチューブを振ると、多くのゲノム DNA がプラスミド DNA と共に分離されます。しかし、この時の混和が不十分だと収量が減ります。

結果

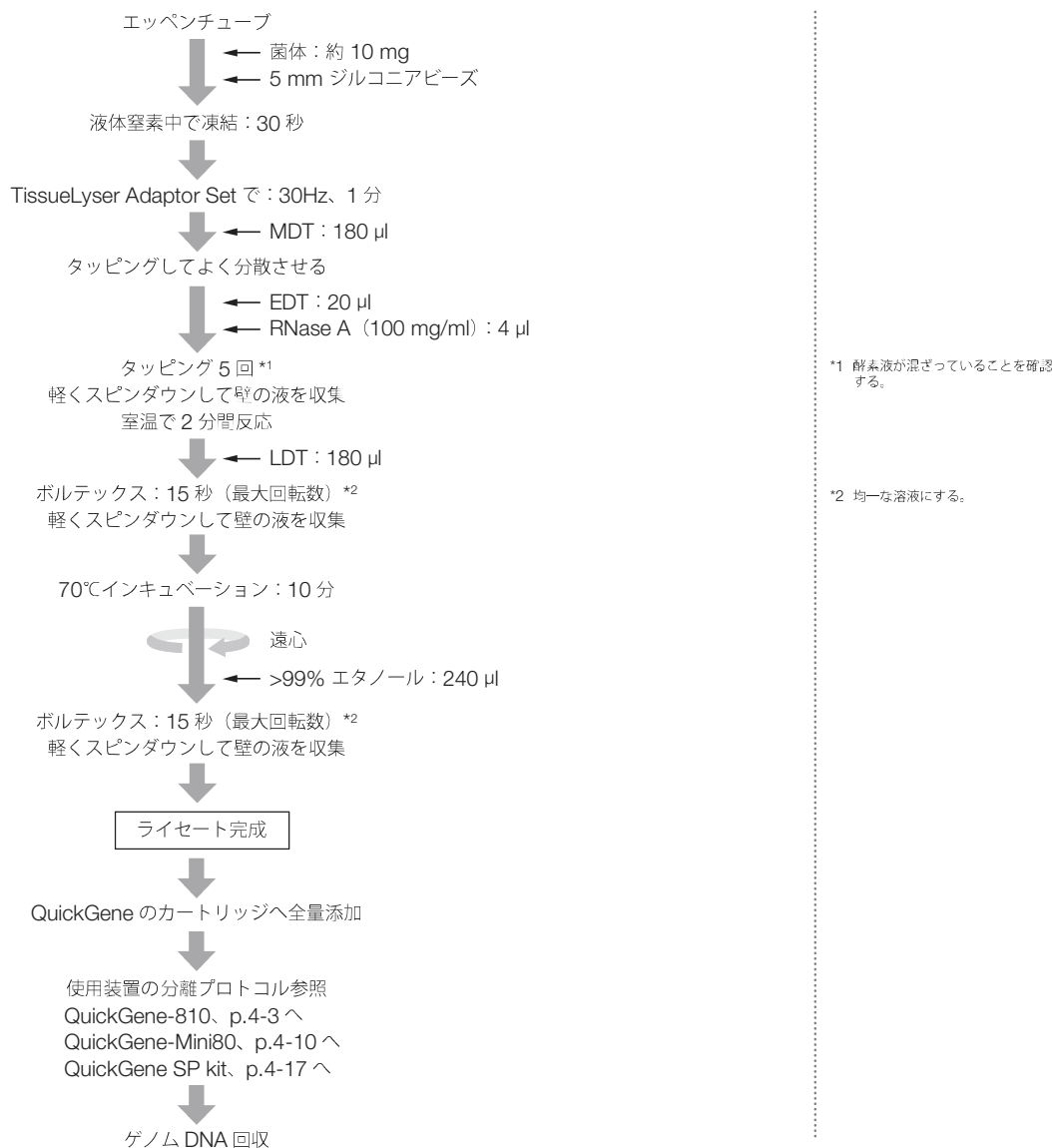
- 電気泳動図
データなし
- フォスミド DNA の収量
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230
データなし
- その他
データなし

共通プロトコルサンプル

プラスミド

放射菌からのゲノムDNA分離

プロトコル



結果

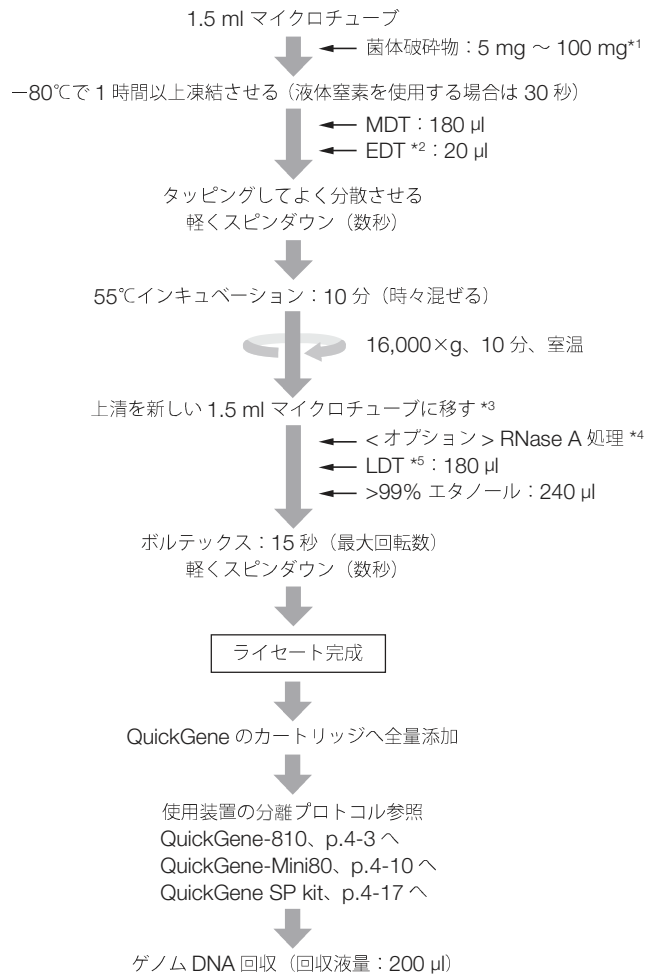
- 電気泳動図
データなし
- ゲノム DNA の収量
データなし
- タンパク質の混入：A260/280
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230
データなし
- その他
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

糸状菌からのゲノムDNA分離

■ プロトコル



*1 使用可能量は菌の種類などによっても異なります。本キットで初めて分離されるサンプルの場合は、予備実験を行ってください。

*2 EDT の効果が無い場合は、省略できます。

*3 残渣が落ちきらない場合は追加で遠心する。

*4 RNase A (100 mg/ml)：20 µl
タッピング (酵素液が混ざっていることを確認する)
軽くスピンドアウン (数秒)

↓
室温インキュベーション：2分

*5 LDT 添加後に沈殿が生じた場合は 70°C で数分間インキュベートし、沈殿を溶解してから特級エタノール (>99%) を添加してください。

■ 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ ゲノム DNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

データなし

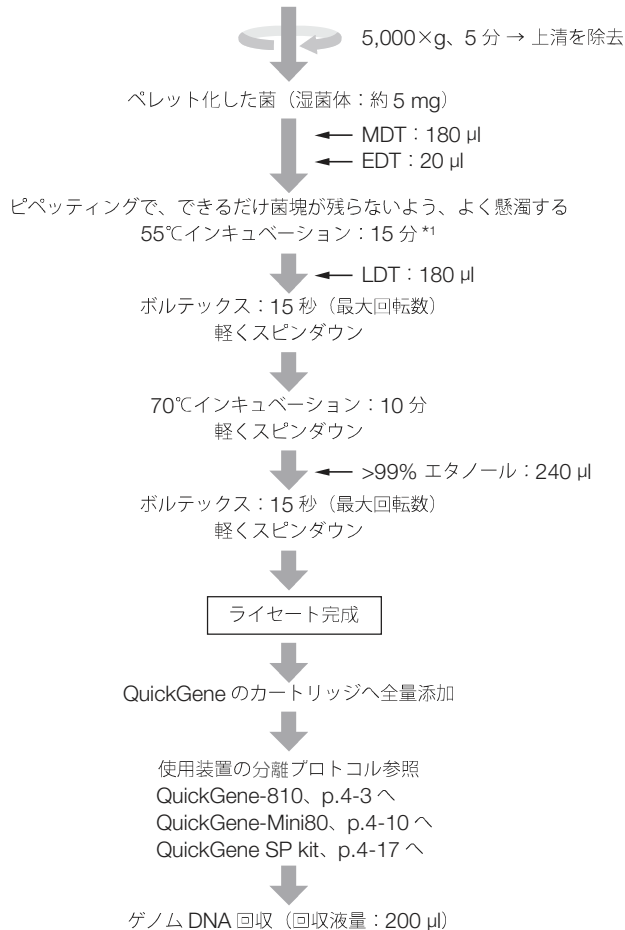
■ 共通プロトコルサンプル

データなし

淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) からのゲノムDNA分離

プロトコル

培養後の液体培地、もしくは寒天培地から釣菌した菌の懸濁液

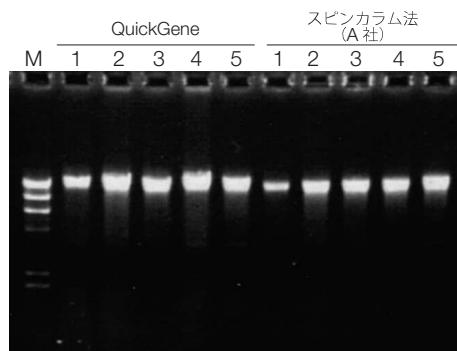


*1 この時間塊が残ってれば、ピペティングで菌塊を壊し、再度インキュベートする。

結果

菌株：臨床分離株 No.1 ~ 5
各湿菌体 約 4.5 ~ 6 mg から分離

電気泳動図



電気泳動条件：1.5% アガロース / 1 × TAE

M：λ-Hind III
1：菌株 No.1
2：菌株 No.2
3：菌株 No.3
4：菌株 No.4
5：菌株 No.5

分離したゲノム DNA に分解は認められなかった。

ゲノム DNA の収量

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
QuickGene	8.5 µg	7.1 µg	11.2 µg	11.0 µg	7.3 µg
スピнкаラム法 (A社)	3.2 µg	6.6 µg	5.8 µg	6.5 µg	4.6 µg

タンパク質の混入：A260/280

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
QuickGene	1.97	2.06	2.39	2.03	2.04
スピнкаラム法 (A社)	2.11	2.05	2.46	2.00	2.05

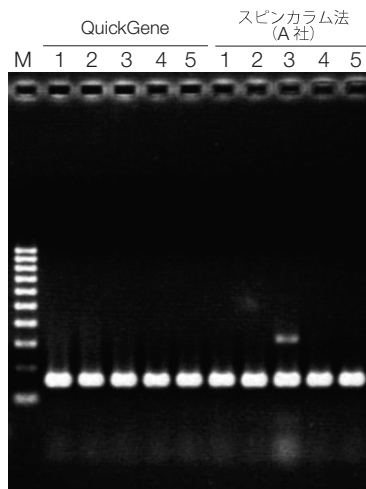
カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

その他

• PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A社) を用いて分離したゲノム DNA で、フルオロキノロン系抗菌薬のターゲットであるトポイソメラーゼIVのサブユニットの ParC 遺伝子の検出を、PCR により行った。



電気泳動条件：2% アガロース / 1 × TAE

M：100 bp DNA Ladder

1：菌株 No.1

2：菌株 No.2

3：菌株 No.3

4：菌株 No.4

5：菌株 No.5

いずれのゲノム DNA からでも PCR 産物を検出できた。

共通プロトコルサンプル

ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)

プロトコル

枯草菌を集菌しペレットを作る (5,000 g×10分)：枯草菌ペレット *1

↓ ← STET : 180 µl *2

ボルテックス (細胞をよく分散させる)
37°Cインキュベーション : 30分

↓ ← EDT : 20 µl

タッピング 5回 (酵素液が混ざっていることを確認)

↓ ← RNase A : 20 µl (オプション) *3

タッピング 5回 (酵素液が混ざっていることを確認)

軽くスピンドウンして壁の液を収集
25°Cインキュベーション : 2分

↓ ← LDT : 180 µl

ボルテックス : 15秒 (最大回転数) *4
軽くスピンドウンして壁の液を収集

70°Cインキュベーション : 10分 *5
軽くスピンドウンして壁の液を収集

↓ ← >99% エタノール : 240 µl

ボルテックス : 15秒 (最大回転数) *6
軽くスピンドウンして壁の液を収集

ライセート完成

QuickGene のカートリッジへ全量添加

使用装置の分離プロトコル参照
QuickGene-810、p.4-3 へ
QuickGene-Mini80、p.4-10 へ
QuickGene SP kit、p.4-17 へ

ゲノム DNA 回収

*1 1×10⁹ 個以下 (OD:0.8、1.2 ml)。

*2 STET:20mM トリス塩酸 (pH8)、
2 mM EDTA (pH8)、1.2%
Triton×100、20 mg/ml
リソチームは使用前に添加する。

*3 細胞で発現している RNA 量により
減量可能。

*4 均一な溶液にする。
(必要に応じてビベッティングする)

*5 必要に応じて病原体不活化 (煮沸)
処理を加える。

*6 均一な溶液にする。

結果

電気泳動図

データなし

ゲノム DNA の収量

データなし

タンパク質の混入 : A260/280

データなし

カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

その他

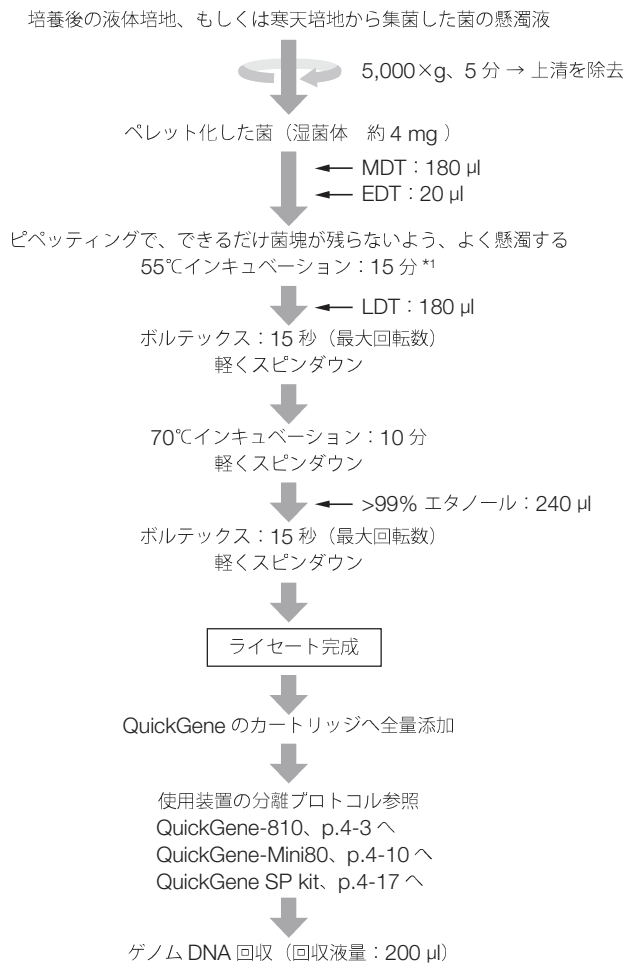
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

ピロリ菌からのゲノムDNA分離

■ プロトコル

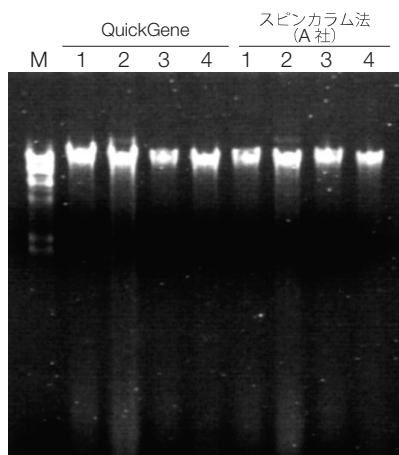


*1 この時菌塊が残っていれば、ピペティングで菌塊を壊し、再度インキュベートする。

■ 結果

菌株 : 各湿菌体 約 4 mg から分離された臨床分離株 No. 1 ~ 4

■ 電気泳動図



電気泳動条件 : 1.5% アガロース / 1 × TAE

M : λ-Hind III

- 1 : 菌株 No.1
- 2 : 菌株 No.2
- 3 : 菌株 No.3
- 4 : 菌株 No.4

分離したゲノム DNA に分解は認められなかった。

ゲノム DNA の収量

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	3.0 µg	4.2 µg	2.0 µg	3.2 µg
スピンカラム法 (A 社)	2.9 µg	4.7 µg	1.0 µg	2.9 µg

タンパク質の混入：A260/280

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	2.01	1.91	1.88	1.93
スピンカラム法 (A 社)	1.92	1.88	1.78	1.82

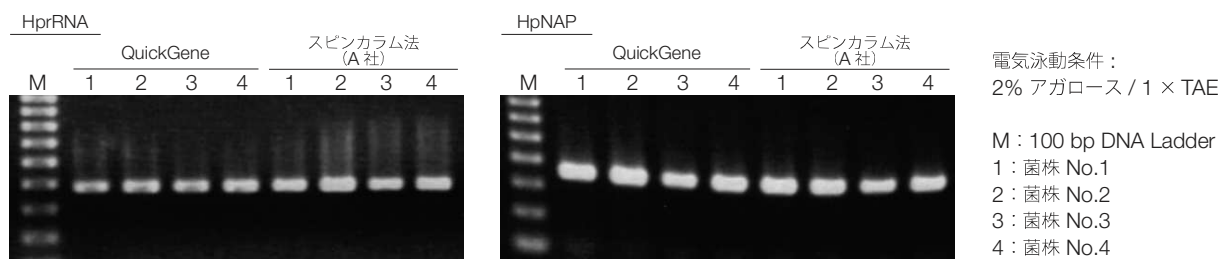
カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

その他

• PCR

QuickGene システムおよびスピンカラム法 (A 社) を用いて分離したゲノム DNA で、ピロリ菌の 16s ribosomal RNA (A) 遺伝子および neutrophil-activating protein (NAP) (B) 遺伝子の検出を、PCR により行った。



いずれのゲノム DNA でも、PCR 産物を検出できた。

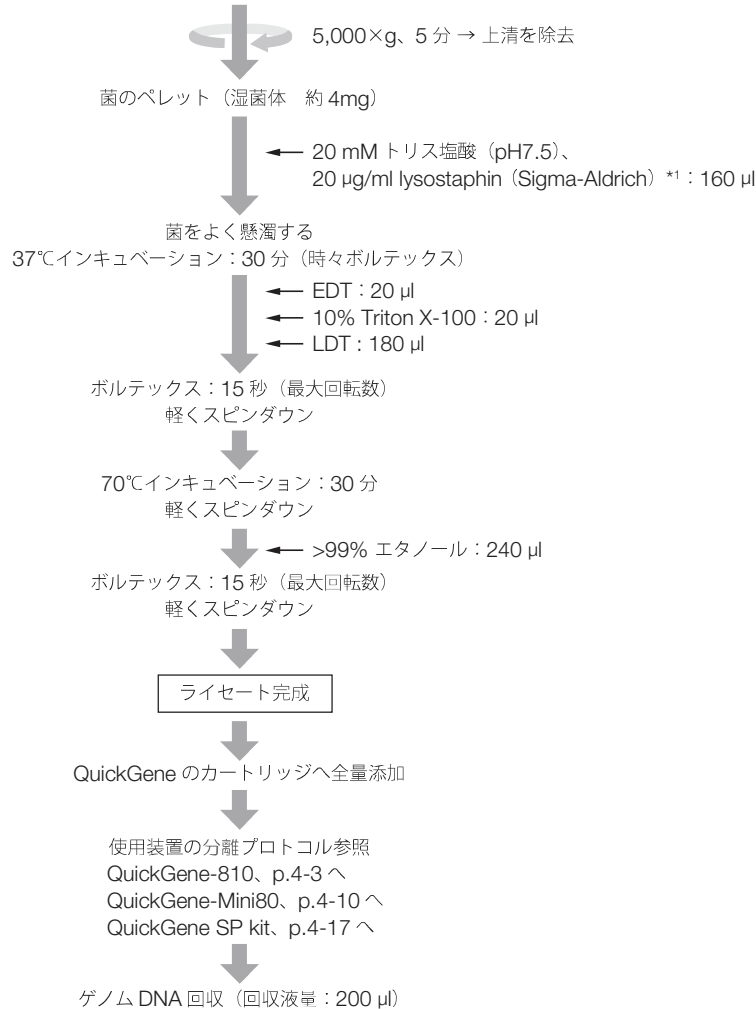
共通プロトコルサンプル

淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) からのゲノムDNA分離

■ プロトコル

培養後の液体培地、もしくは寒天培地から釣菌した菌の懸濁液

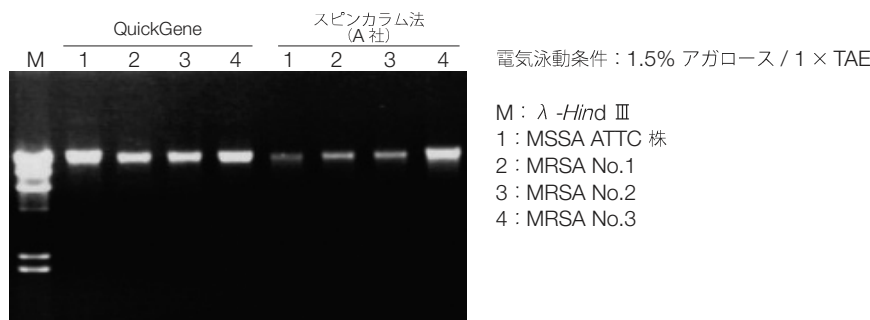
*1 "20 mM トリス塩酸 (pH7.5)、
20 µg/ml lysostaphin (Sigma-Aldrich)" はキットに含まれておりません。
lysostaphin は使用前に添加してください。

■ 結果

菌株: メチシリン感受性菌 (MSSA) 標準株 (ATCC25923)

菌株: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 臨床分離株 No.1 ~ 3
各湿菌体 約4mg から分離

■ 電気泳動図



ゲノム DNA の収量

サンプル	MSSA	MRSA No.1	MRSA No.2	MRSA No.3
QuickGene	16.0 µg	14.4 µg	10.2 µg	10.3 µg
スピнкаラム法 (A 社)	2.7 µg	4.6 µg	9.1 µg	12.5 µg

タンパク質の混入：A260/280

サンプル	MSSA	MRSA No.1	MRSA No.2	MRSA No.3
QuickGene	1.76	1.70	1.70	1.76
スピнкаラム法 (A 社)	1.80	1.76	1.73	1.95

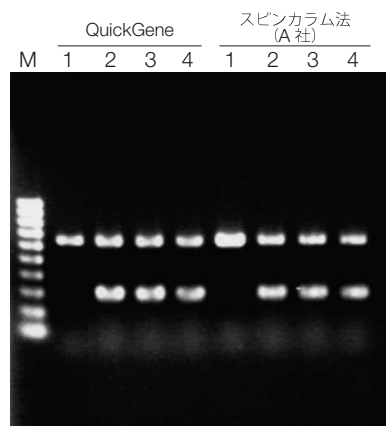
カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

その他

• PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて分離したゲノム DNA で、黄色ブドウ球菌遺伝子の *FemA* と MRSA に見られる *mecA* 遺伝子の検出を PCR 法 [Jonas, D. et al. 「Rapid PCR based Identification of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus from Screening Swabs.」 J. Clin. Microbiol. 2002 ; 40, 1821-1823.] により行った。



電気泳動条件：2% アガロース / 1 × TAE

M : 100 bp DNA Ladder
 1 : MSSA ATT 株
 2 : MRSA No.1
 3 : MRSA No.2
 4 : MRSA No.3

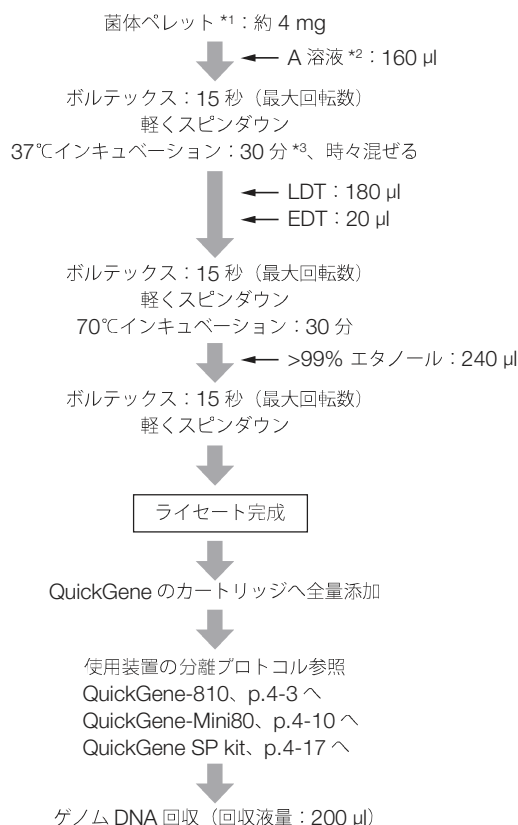
MSSA (ATCC 標準株) では *femB* のみが、MRSA では *femB* と *mecA* の両方が検出された。

共通プロトコルサンプル

データなし

ペニシリン耐性肺炎球菌 (*Streptococcus Pneumoniae*, PRSP) からのゲノムDNA分離

プロトコル



*1 集菌遠心条件 (5,000×g、5 分)

*2 A 溶液: 20 mM トリス塩酸
(pH 7.5)
2 mM EDTA
1.2% Triton X-100
20 mg/ml リゾチーム

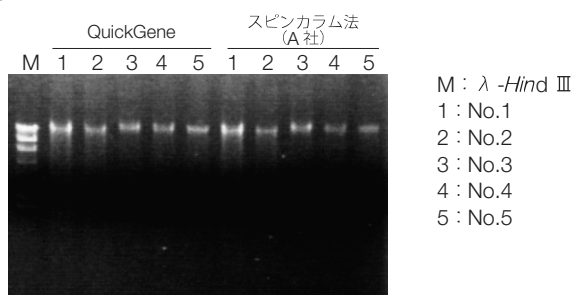
* リゾチームは要事調整で加える

*3 溶液が乳白色に濁る、もしくは沈殿物が生じることがありますが次のステップで溶解します。

結果

- 菌株 No.1: R6 (肺炎球菌標準株)
No.2: PISP 臨床分離株 (ペニシリン中程度耐性肺炎球菌)
No.3: PISP 臨床分離株 (ペニシリン中程度耐性肺炎球菌)
No.4: PRSP 臨床分離株 (ペニシリン高度耐性肺炎球菌)
No.5: PRSP 臨床分離株 (ペニシリン高度耐性肺炎球菌)

電気泳動図



ゲノム DNA の収量

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
QuickGene	12.6 μg	4.8 μg	8.6 μg	9.1 μg	8.3 μg
スピнкаラム法 (A社)	10.6 μg	5.8 μg	10.0 μg	8.0 μg	5.4 μg

タンパク質の混入：A260/280

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
QuickGene	1.88	2.14	1.74	2.00	1.96
スピナラム法 (A社)	2.11	1.75	1.96	1.70	2.05

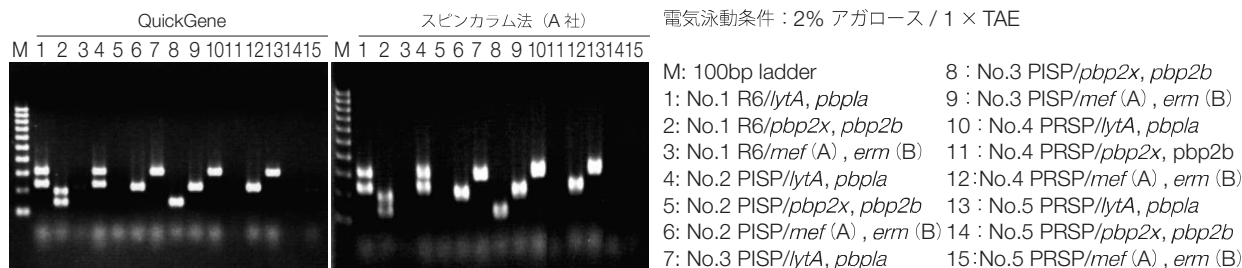
カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

その他

● PCR

QuickGene システムおよびスピナラム法 (A社) を用いて肺炎球菌から分離したゲノム DNA で、*Lyt A* 遺伝子^{*4}、ペニシリン結合タンパク質遺伝子^{*5} (*pbpla*、*pbp2x*、*pbp2b*) さらにマクロライド耐性遺伝子 (*mef (A)*、*erm (B)*) を PCR で検出した。



*4：溶菌酵素遺伝子であり、肺炎球菌のポジティブコントロール。

*5：耐性変異が起きた場合は遺伝子が増幅されないようにプライマーが設計されている。

	<i>lytA</i>	<i>pbp1a</i>	<i>pbp2x</i>	<i>pbp2b</i>	<i>mef (A)</i>	<i>erm (B)</i>
No.1 R6	+	+	+	+	-	-
No.2 PISP	+	+	-	-	-	+
No.3 PISP	+	-	-	+	-	+
No.4 PRSP	+	-	-	-	-	+
No.5 PRSP	+	-	-	-	-	-

No.1 R6 ではペニシリン結合タンパク質遺伝子耐性変異もマクロライド耐性遺伝子も検出されなかった。
 No.2 PISP は *pbp2x*、*pbp2b* の耐性変異と *erm (B)* の存在が認められた。
 No.3 PISP は *pbpla*、*pbp2x* の耐性変異と *erm (B)* の存在が認められた。
 No.4 PRSP は *pbpla*、*pbp2x*、*pbp2b* の耐性変異と *erm (B)* の存在が認められた。
 No.5 PRSP は *pbpla*、*pbp2x*、*pbp2b* の耐性変異が認められたが、マクロライド耐性遺伝子の存在は認められなかった。

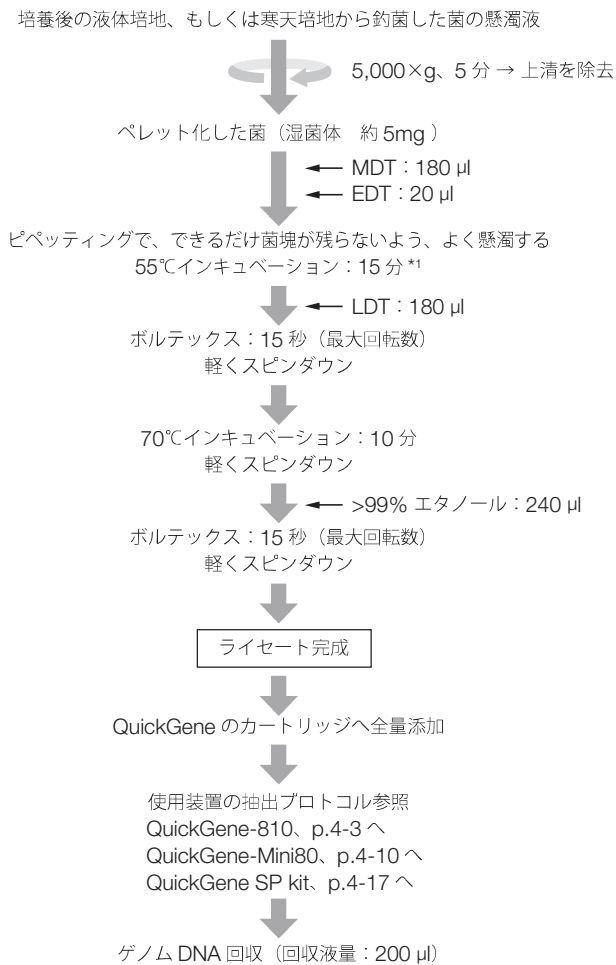
以上のように、良好な PCR による薬剤耐性遺伝子解析の結果が得られた。

共通プロトコルサンプル

バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) からのゲノムDNA分離

■ プロトコル

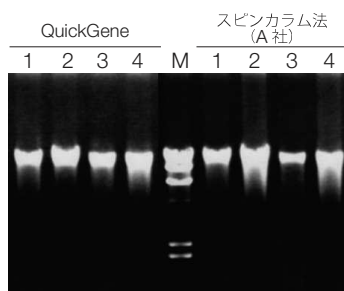


*1 この時菌塊が残っていても、ピペティングで菌塊を壊し、再度インキュベートする。

■ 結果

- 菌株 No.1 : S792 (血清型 G)
菌株 No.2 : S728 (血清型 G、ムコイド株)
No.3 : S715 (血清型 E)
No.4 : S1067 (ラフ株)

■ 電気泳動図



電気泳動条件 : 1.5% アガロース / 1 × TAE

M : λ-Hind III

- 1 : No.1 S792 (血清型 G)
2 : No.2 S728 (血清型 G、ムコイド株)
3 : No.3 S715 (血清型 E)
4 : No.4 S1067 (ラフ株)

分離したゲノムDNAに分解は認められなかった。

ゲノム DNA の収量

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	11.4 µg	12.4 µg	10.0 µg	14.0 µg
スピнкаラム法 (A 社)	10.8 µg	14.0 µg	7.4 µg	13.0 µg

タンパク質の混入：A260/280

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	2.23	1.90	2.31	2.18
スピнкаラム法 (A 社)	1.96	1.78	1.93	2.12

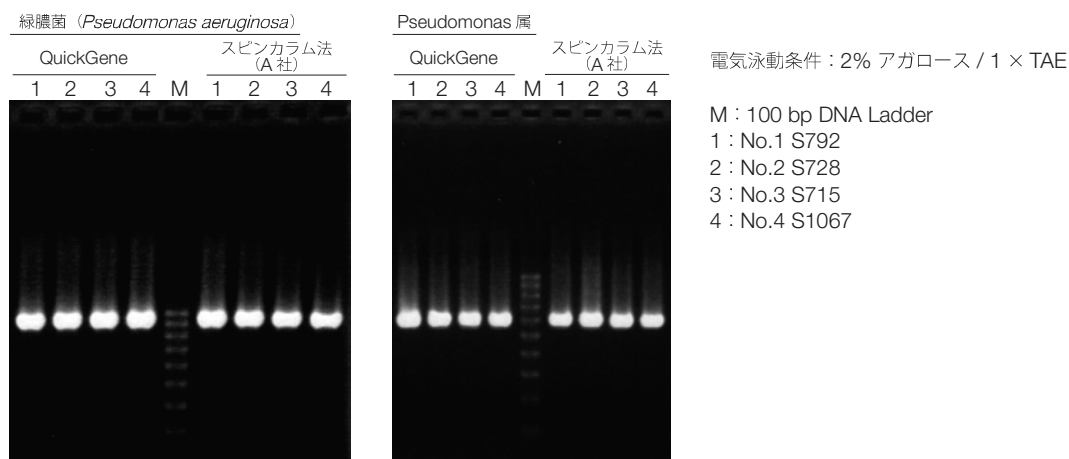
カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

その他

● PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて緑膿菌菌体から分離したゲノム DNA で、16srRNA 遺伝子の検出を、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) に特異的なプライマーおよび *Pseudomonas* 属特異的なプライマーを使用した PCR により行った。



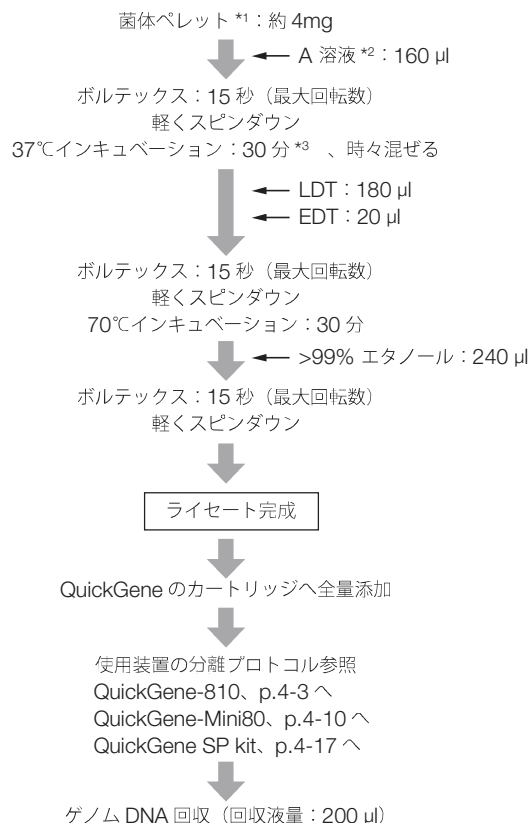
いずれのゲノム DNA でも PCR 産物を検出できた。

共通プロトコルサンプル

淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、ピロリ菌

バンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin-resistant *Enterococcus*; VRE) からのゲノムDNA分離

プロトコル

*1 集菌遠心条件 (5,000 \times g、5 分)*2 A 溶液 : 20 mM トリス塩酸
(pH 7.5)
2 mM EDTA
1.2% Triton X-100
20 mg/ml リゾチーム

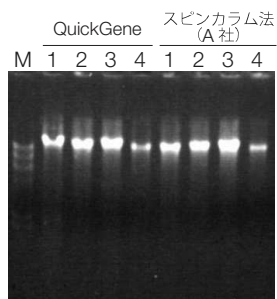
* リゾチームは要調整で加える

*3 溶液が乳白色に濁る、もしくは沈殿物が生じることがありますが次のステップで溶解します。

結果

- 菌株 No.1 : バンコマイシン感受性 *E.faecium* (バンコマイシン感受性腸球菌臨床分離株)
No.2 : バンコマイシン感受性 *E.faecalis* (バンコマイシン感受性腸球菌臨床分離株)
No.3 : バンコマイシン耐性 *E.faecalis* (バンコマイシン耐性腸球菌臨床分離株)
No.4 : バンコマイシン耐性 *E.faecalis* (バンコマイシン耐性腸球菌臨床分離株)

電気泳動図

M : λ -Hind III

1 : No.1

2 : No.2

3 : No.3

4 : No.4

ゲノム DNA の収量

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	11.1 μ g	7.4 μ g	9.6 μ g	3.0 μ g
スピнкаラム法 (A社)	4.2 μ g	7.0 μ g	11.1 μ g	1.8 μ g

■ タンパク質の混入：A260/280

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	2.03	1.75	1.94	1.78
スピンカラム法 (A社)	1.73	1.70	1.96	1.70

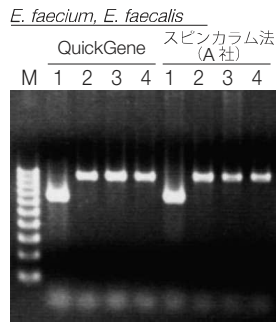
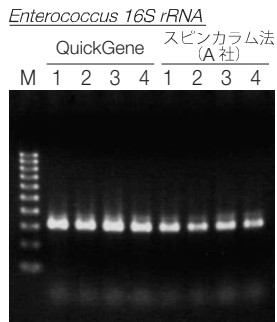
■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

● PCR

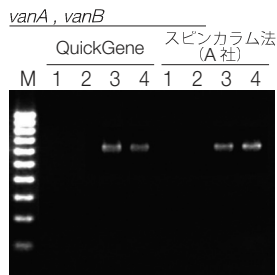
QuickGene システムおよびスピンカラム法 (A社) を用いて腸球菌から分離したゲノム DNA で、*Enterococcus 16S rRNA*、*E.faecium**⁴、*E.faecalis**⁵、薬剤耐性遺伝子 (*vanA**⁶、*vanB**⁷) を PCR で検出した。



電気泳動条件：2% アガロース / 1 × TAE

M：100 bp DNA Ladder

- 1：No.1 バンコマイシン感受性 *E. faecium*
(バンコマイシン感受性腸球菌臨床分離株)
- 2：No.2 バンコマイシン感受性 *E. faecalis*
(バンコマイシン感受性腸球菌臨床分離株)
- 3：No.3 バンコマイシン耐性 *E. faecalis*
(バンコマイシン耐性腸球菌臨床分離株)
- 4：No.4 バンコマイシン耐性 *E. faecalis*
(バンコマイシン耐性腸球菌臨床分離株)



- No.1 バンコマイシン感受性 *E. faecium* は *vanA*、*vanB* 陰性の *E. faecium* と同定された。
- No.2 バンコマイシン感受性 *E. faecalis* は *vanA*、*vanB* 陰性の *E. faecalis* と同定された。
- No.3、4 バンコマイシン感受性 *E. faecalis* は *vanA* 陰性、*vanB* 陽性の *E. faecalis* と同定された。

いずれのプライマーを用いた場合も良好な結果が得られ、生化学的な検討と一致する結果であった。

*4：*E. faecium* 特異的プライマー (658 bp)
*6：薬剤耐性遺伝子 *vanA* (732 bp)

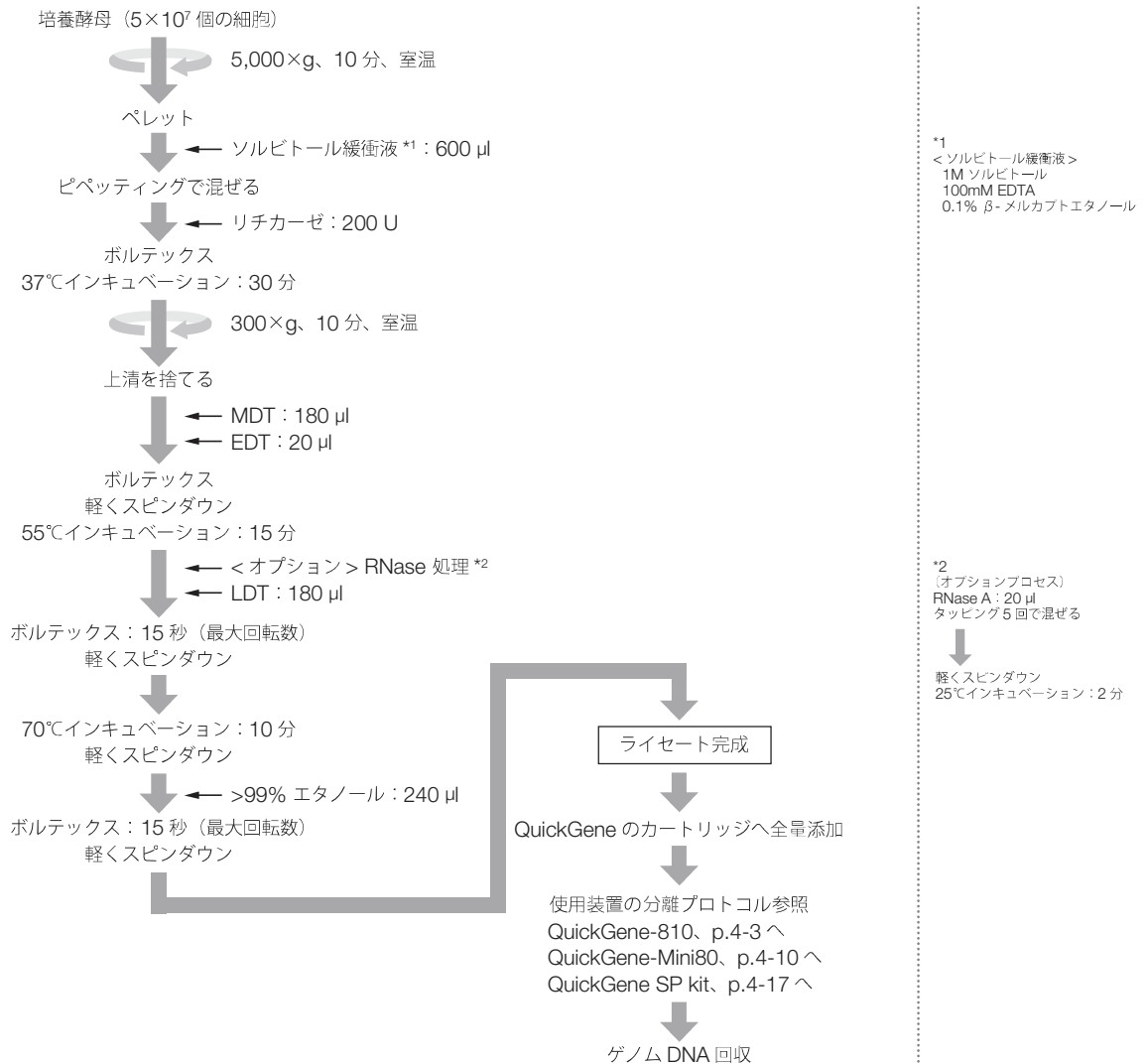
*5：*E. faecalis* 特異的プライマー (941 bp)
*7：薬剤耐性遺伝子 *vanB* (635 bp)

■ 共通プロトコルサンプル

ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP)

酵母からのゲノムDNA分離

| プロトコル



| 結果

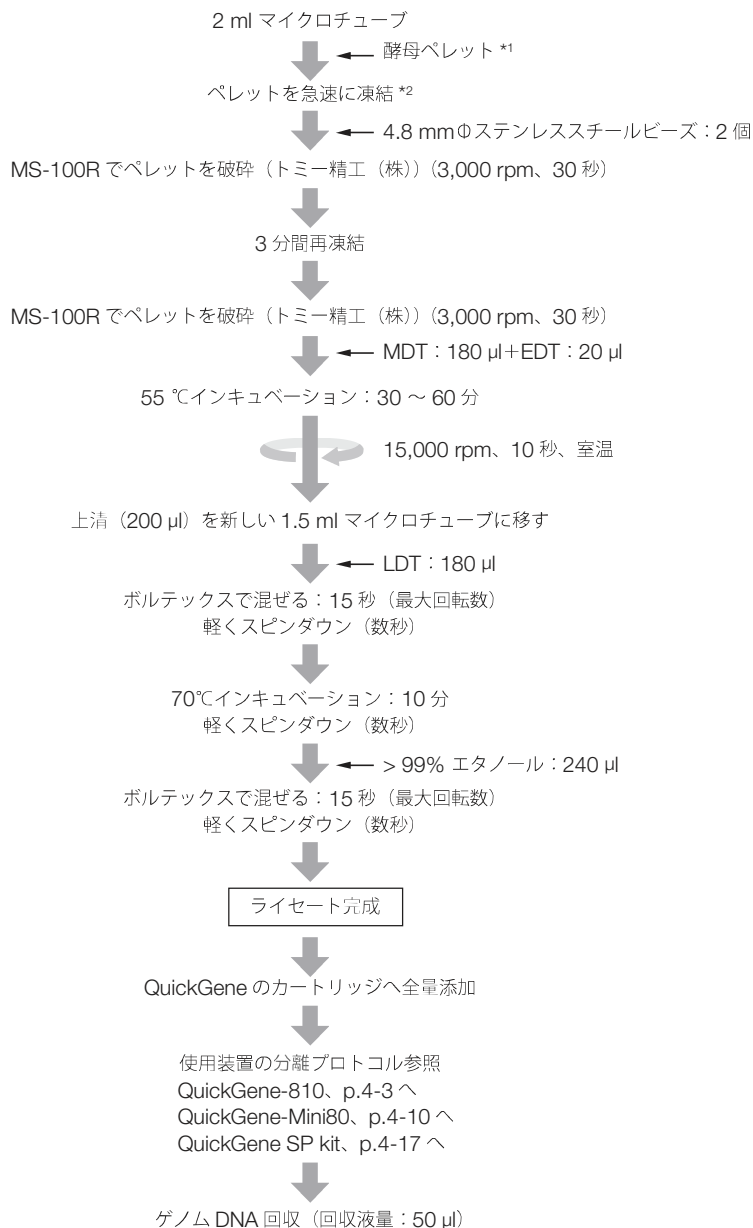
- 電気泳動図
データなし
- ゲノム DNA の収量
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230
データなし
- その他
データなし

| 共通プロトコルサンプル

データなし

酵母からのゲノムDNA分離（ビーズホモジナイズ法）

プロトコル

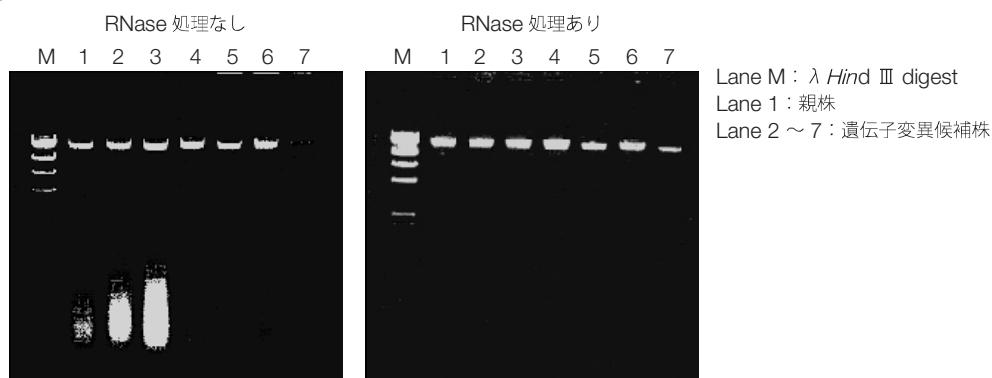


*1 30°Cで16時間、5 ml YPAD 中で培地を振とう後、全酵母細胞を遠心で集菌する [OD600=app.3]。

*2 チューブを、10 分以上ドライアイス-エタノールに浸す。

結果

電気泳動図



ゲノム DNA の収量 (RNase 処理なし)

	収量 (μ g)
1	79.4
2	111.1
3	127.8
4	35.0
5	30.2
6	53.3
7	10.7

タンパク質の混入: A260/280

	純度 (A260/280)
1	2.12
2	2.13
3	2.12
4	2.01
5	1.85
6	1.99
7	1.67

カオトロピック塩の混入: A260/230

データなし

その他

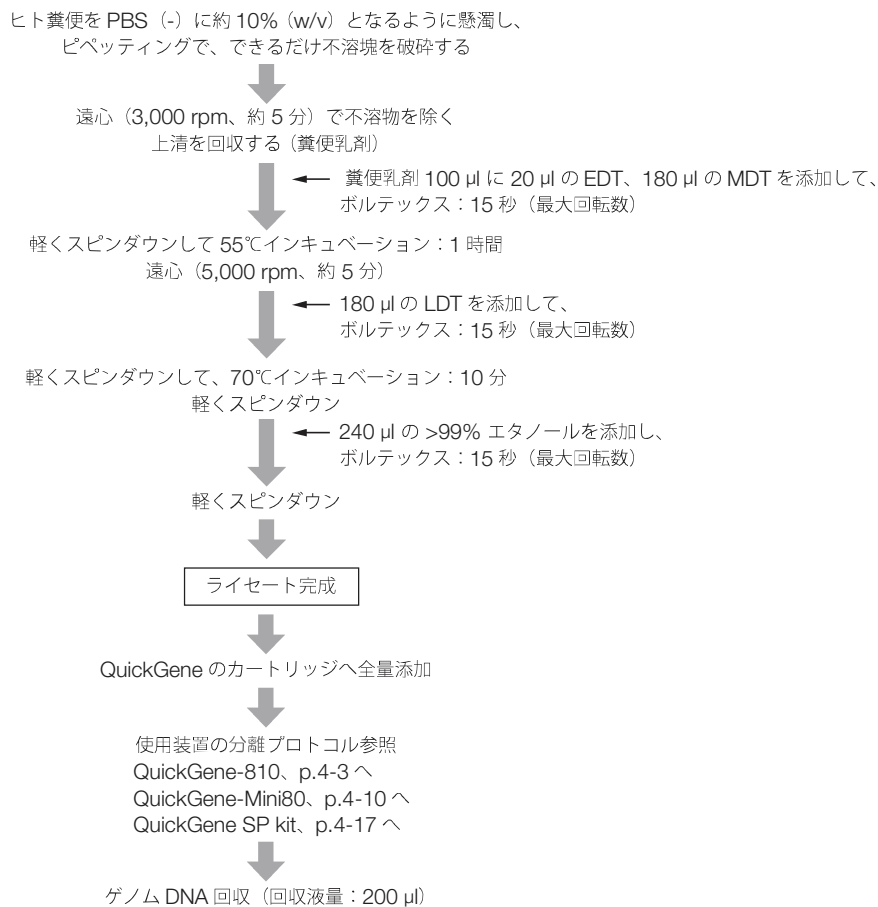
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

ヒト糞便からのピロリ菌ゲノムDNA分離

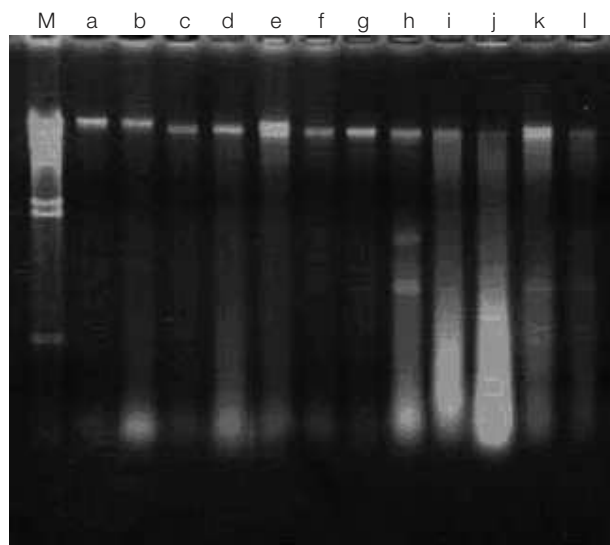
プロトコル



結果

電気泳動図

ヒト糞便由来 DNA のアガロース電気泳動図 (1.5% アガロースゲル)



M : marker (λ -Hind III)
a, g : No.1 (糞便、ピロリ陽性)
b, h : No.2 (糞便、ピロリ陽性)
c, i : No.3 (糞便、ピロリ陽性)
d, j : No.4 (糞便、ピロリ陽性)
e, k : No.5 (糞便、ピロリ陰性)
f, l : No.6 (糞便、ピロリ陰性)

a, f : QuickGene
g, l : A 社

ゲノム DNA の収量

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
QuickGene	0.48	1.92	0.40	1.48	3.28	1.32
A社 スピнкаラム法	2.48	0.76	1.36	4.8	5.68	0.48

QuickGene システムの方が収量の低い検体が認められたが、アガロース電気泳動像から、A社キットで精製した標品の方で、分解によると思われる低分子量の物質が多く認められた。紫外線吸収による算出では、低分子量の物質を含めた値となっており、収量が高く出ていることが考えられた。以上の結果から、QuickGene システムの方が、分解の少ないゲノム DNA が効率良く精製されていると考えられる。

タンパク質の混入：A260/280

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
QuickGene	1.73	2.10	1.74	1.90	2.03	1.96
A社 スピнкаラム法	1.83	1.76	1.72	1.70	1.65	1.73

カオトロピック塩の混入：A260/230

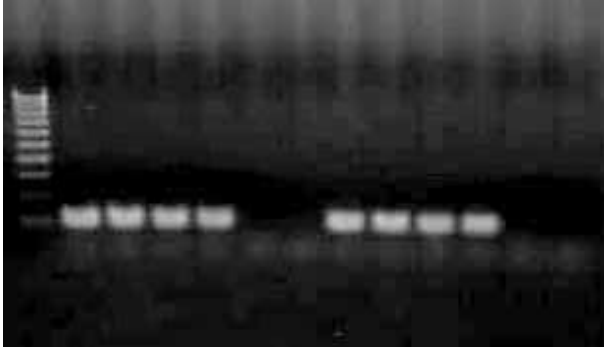
データなし

その他

• PCR

ピロリ菌 16S rRNA をコードするゲノム DNA の nested PCR による検出

M a b c d e f g h i j k l



M : マーカー (100 bp ladder)

a, g : No.1 (糞便、ピロリ陽性)

b, h : No.2 (糞便、ピロリ陽性)

c, i : No.3 (糞便、ピロリ陽性)

d, j : No.4 (糞便、ピロリ陽性)

e, k : No.5 (糞便、ピロリ陰性)

f, l : No.6 (糞便、ピロリ陰性)

a, f : QuickGene

g, l : A社

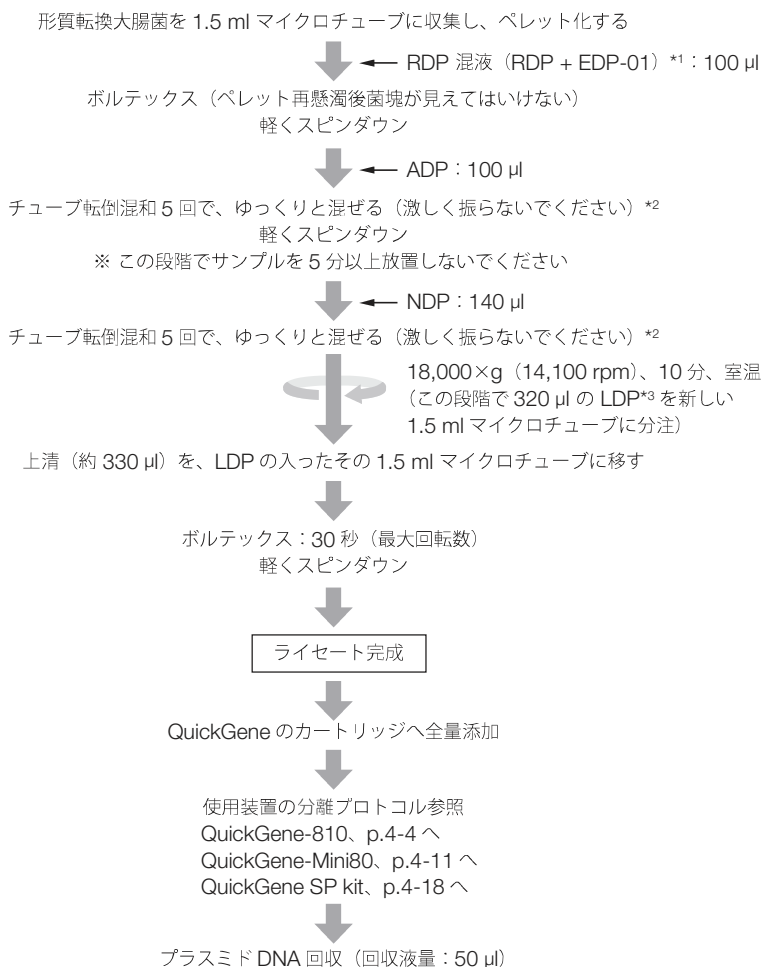
ヒト糞便から QuickGene で調製した DNA を用いて nested PCR にて、テストメイトラピッドピロリ抗原キットで陽性と判定された患者の糞便からピロリ菌の DNA を検出することができた。

共通プロトコルサンプル

データなし

大腸菌からのプラスミドDNA分離

プロトコル



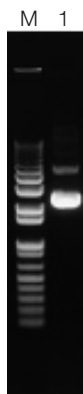
*1 分離を始める前に、EDP-01 の全量を PDP ボトルに添加し、よく混ぜてください。PDP 混液を貯蔵する場合は、冷蔵 (2~8℃) 保存し、6 ヶ月以内に使用することを推奨します。

*2 ADP または NDP 添加後直ぐにチューブを 5 回転倒混和で混ぜてください。激しい混合はゲノム DNA の多くの共精製を起こします。混合がゆっくりすぎると液体の不十分な混合が起こり、プラスミド DNA の収量低下を生じます。

*3 使用前に 44 ml の >99% エタノールをボトルに添加し、ボトルの穏やかな転倒混和でよく混ぜてください。

結果

電気泳動図



1 : QuickGene

M : マーカー
(1 Kb Plus DNA Ladder : Invitrogen)

■ プラスミド DNA の収量

キット	収量
QuickGene	21.4 µg

■ タンパク質の混入：A260/280

キット	A260/280
QuickGene	1.99

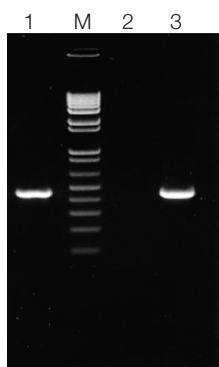
■ カオトロピック塩の混入：A260/230

キット	A260/230
QuickGene	2.49

■ その他

• PCR

GAPDH をターゲットに使用し、QuickGene システムで分離した 5 ng のテンプレートに対して PCR を行った。



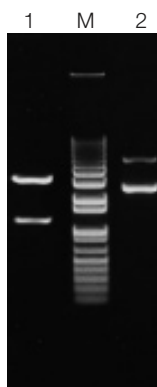
1 : QuickGene
2 : ネガティブコントロール
3 : ポジティブコントロール

M: マーカー (100 bp DNA Ladder : Invitrogen)

5 ng のテンプレートから PCR 増幅が可能である。

• *Not* I and *Xho* I での制限酵素切断

QuickGene システムを用いて形質転換大腸菌から分離したプラスミド DNA に対して制限酵素処理を行った。
制限エンドヌクレアーゼ (*Not* I および *Xho* I のそれぞれに 0.5 µl) を 10 µl の反応溶液 (1 µl の分離プラスミドを含む) に添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。



1 : QuickGene (*Not* I + *Xho* I)
2 : None

M : マーカー (1 Kb Plus DNA Ladder : Invitrogen)

これらの結果から、制限酵素処理が行えることがわかる。

■ 共通プロトコルサンプル

フォスミド

