



食品からの腸管出血性大腸菌検査のための DNA 抽出プロトコール

NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10、740952.50、740952.250)

	細菌		
1. サンプルの準備		増菌培養液*1 0.1 ml をマイクロチューブにいれ、10,000 × g で 10 分間遠心し、上清を除去し、沈渣を用意する。	
2. Proteinase K 処理		Buffer T1 180 μl, Proteinase K 溶液*2 25 μl を細菌のペレットに添加し、激しく攪拌する。56°C で 1 時間インキュベートする。 溶解しなかった場合：56°C でのインキュベートを 3 時間(または一晩)まで延長し、完全に溶解する。	
3. サンプルの溶解		サンプルを攪拌する。Buffer B3 200 μl を加えて、激しく攪拌した後、70°C で 10 分間インキュベートする。 不溶物が残る場合は、11,000 × g、5 分間遠心し、上清を新しいチューブに移す。	
4. エタノールの添加		96~100%エタノール 210 μl を添加し、よく混合する。	
5. カラムへの吸着		NucleoSpin Tissue Column を Collection Tube にセットする。 4 の溶液をカラムに添加し、11,000 × g、1 分間遠心する。 ろ液を捨て、新しい Collection Tube にカラムをセットする。	
6. メンブレンの洗浄		<u>1 回目の洗浄</u> Buffer BW 500 μl をカラムに添加し、11,000 × g で 1 分間遠心する。 ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。 <u>2 回目の洗浄</u> Buffer B5*2 600 μl をカラムに添加し、11,000 × g で 1 分間遠心する。 ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。	 
7. メンブレンの乾燥		カラムを、11,000 × g で 1 分間遠心する。	

<p>8. DNA の溶出</p>	<div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="flex-grow: 1;"> <p>カラムをマイクロチューブ(1.5 ml: 各自で用意)にセットする。</p> <p>70°Cに温めた Buffer BE*3 100 μl を加え、室温で 1 分間インキュベートした後、11,000 × g で 1 分間遠心する。</p> <p>溶出した DNA 溶液は、4°C、長期保存の場合は、-20°Cで保存する。(凍結融解はできるだけ繰り返さない)</p> </div>  </div>
-------------------	--

***1 培養液の調製法**

「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」(食安監発 1120 第 1 号、平成 26 年 11 月 20 日)に記載された方法で、増菌培養を行う。

***2 Proteinase K 溶液、Buffer B5 の調製法**

NucleSpin Tissue(製品コード 740952.10)の取扱説明書に従ってください。

***3 Buffer BE の組成**

5 mM Tris-HCl, pH8.5