

「ISOSPIN Blood & Plasma DNA」を使用した 環境水からのDNA抽出の検討

【目的】

環境水からの「ISOSPIN Blood & Plasma DNA」を用いてDNA抽出を行うことができるか検討する。

【プロトコール】

「環境DNA 調査・実験マニュアル」を参考に検証(詳細は別紙参照)

【対象試料】

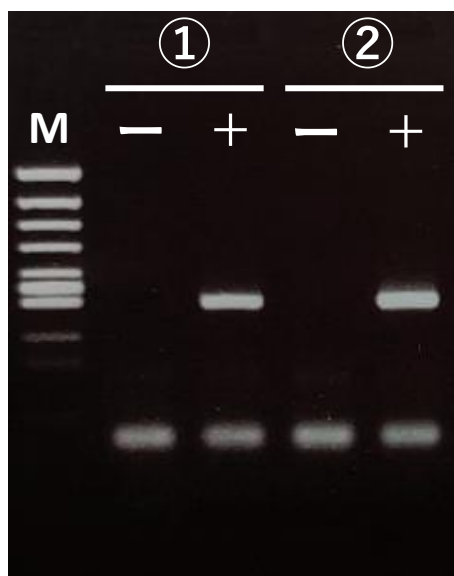
海水ろ過後のグラスファイバーフィルター(2枚)

【結果：PCR産物の電気泳動】

PCR条件

プライマー：硬骨魚類用① (硬骨魚類全般に適用可能なユニバーサルプライマー)

PCR酵素：Hot-Start Gene RED PCR Mix



M: OneSTEP Marker 5
3% Agarose21/TAE EtBr

① DNeasy Blood & Tissue kit
② ISOSPIN Blood & Plasma DNA

—：ブランク
+：海水ろ過フィルター

【結論】

ISOSPIN Blood & Plasma DNAを用いた海水試料からのDNA抽出において、「環境 DNA 調査・実験マニュアル」でDNA抽出キットとして推奨されているDNeasy Blood & Tissue kitを用いた場合と同等のPCR産物を得ることができた。

[別紙] プロトコール：ISOSPIN Blood & Plasma DNA 海水試料からのDNA抽出

サリハット (吸水部材を除き海水サンプルをろ過したフィルターを2枚まとめて入れる)

← D.W.で2倍希釈したBE Buffer 400 μ l とProteinase K 20 μ lを混合後、添加

ヒートブロック56°C 30min 加温 (アルミホイルをかぶせる)

遠心 (3,000xg, 3min, 室温) (サリハットを15mL容チューブにのせて)

サリハット内のフィルターにD.W.で2倍希釈したBE Buffer 220 μ lをかけ、1min静置

遠心 (3,000xg, 3min, 室温)

ろ液に400 μ lのエタノールを添加し、ピペッティングで混和

Spin Columnに混合液を650 μ lアプライ

遠心 (12,000xg, 1min, 室温) し、ろ液を捨てる

サリハット下部に残っているDNA溶液を再度Spin Columnに添加

遠心 (12,000xg, 1min, 室温)
ろ液を捨て、カラムを新しいCollection Tubeに装着

← 750 μ l BW1 Buffer を添加
遠心 (12,000xg, 1min, 室温)
ろ液を捨て、カラムを新しいCollection Tubeに装着

← 500 μ l BW2 Bufferを添加
遠心 (12,000xg, 5 min, 室温)
ろ液を捨て、カラムを新しいCollection Tubeに装着

カラムをDNA低吸着の1.5mL チューブに載せ替える

← Elution Buffer 100 μ lを添加し、3分間静置

遠心 (12,000xg, 1min, 室温)

DNA溶液