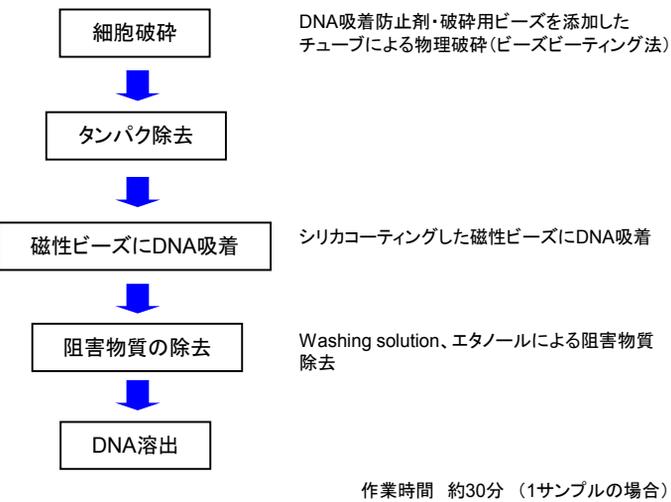


環境試料用DNA抽出キット (Extrap Soil DNA Kit Plus) の評価

抽出キット Extrap soil DNA Kit Plus プロトコル



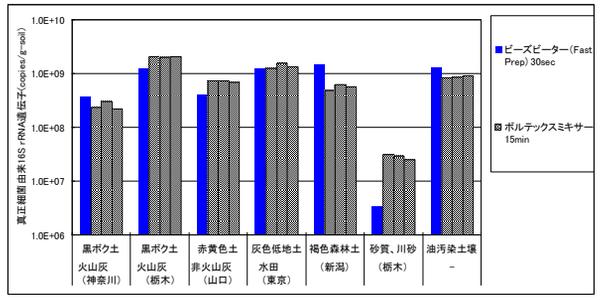
ボルテックスミキサーの適用確認

ボルテックスミキサーを破砕装置として適用できるか検討を行った。

- 使用装置**
- ・ボルテックスミキサー Vortex-Genie 2 (Scientific Industries社製)
 - ・ボルテックスアダプター Vortex Adapter for Vortex-Genie 2 (キアゲン社製 (IBMO BIO Laboratories社製))



<処理条件> Speed: Max, 破砕時間: 15min



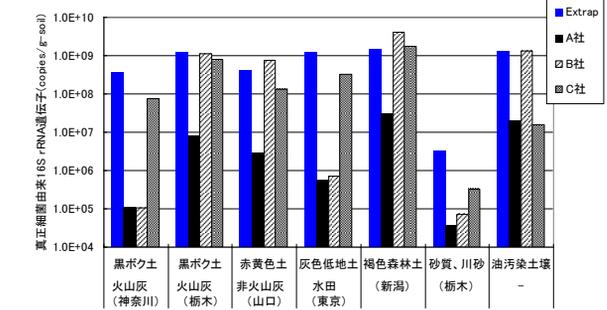
- ・すべての土壌において、ビーズビーターと同等の定量結果が得られた。
- ・ボルテックスアダプターへの試料の装着位置による破砕効率のバラツキは見られなかった。

他社キットとの比較

性状の異なる土壌7種類から、Extrap と他社キット (A社、B社、C社) を用いてDNAを抽出し、抽出効率・阻害物質除去効果を比較した。

DNA抽出効率の比較

(PCR阻害物質の影響を取り除くため、100倍希釈液をリアルタイムPCR法の鋳型として使用した。)



Extrap DNA回収効率が他社キットと比較して同等以上であることを確認

PCR阻害物質除去効果の比較

$$\text{無希釈DNA試料の定量値} \div \text{定量値 (100倍希釈DNA試料の定量値)}$$

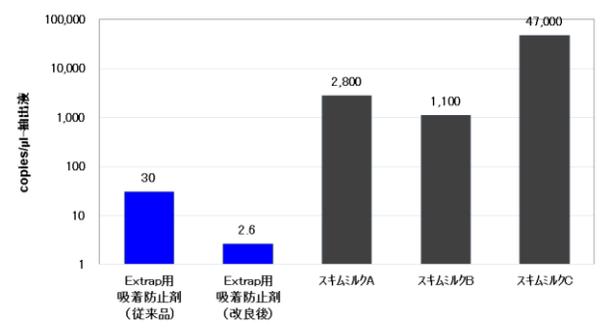
→PCR阻害がなければ1に近く、値が小さいほどPCR阻害が大きい。0.5以下を赤字で示した。

	Extrap	A社	B社	C社
黒ボク土 火山灰 (神奈川)	0.6	0.2	0.1	0.8
黒ボク土 火山灰 (栃木)	0.6	0.9	0.7	0.6
赤黄色土 非火山灰 (山口)	0.8	0.7	0.8	0.8
灰色低地土 水田 (東京)	0.9	0.1	0.4	1.1
褐色森林土 (新潟)	1.0	1.3	-	1.1
砂質、川砂 (栃木)	0.7	0.1	0.3	0.01
油汚染土壌	0.6	0.7	1.0	0.6
平均	0.74	0.57	0.55	0.72

ExtrapのPCR阻害物質の除去効果は、他社キットと同等以上であることを確認

DNA吸着防止剤に含まれる真正細菌由来DNA量の調査

DNA吸着防止剤として汎用されるスキムミルクには微生物由来DNAが混入していることが懸念される。そこで、新たに選定したExtrap用 DNA吸着防止剤およびスキムミルク (国内で購入できる3種類) に含まれる真正細菌由来DNA量を比較した。



・破砕チューブへの一般的な添加量である20mgでは、スキムミルクの場合、抽出液1μLあたり1,100コピー以上の夾雑DNAを含んでいた。一方、Extrapの吸着防止剤の場合、改良により夾雑DNAをさらに低減させることに成功。夾雑DNAは2.6 copies/μL抽出液しか含まれていない。

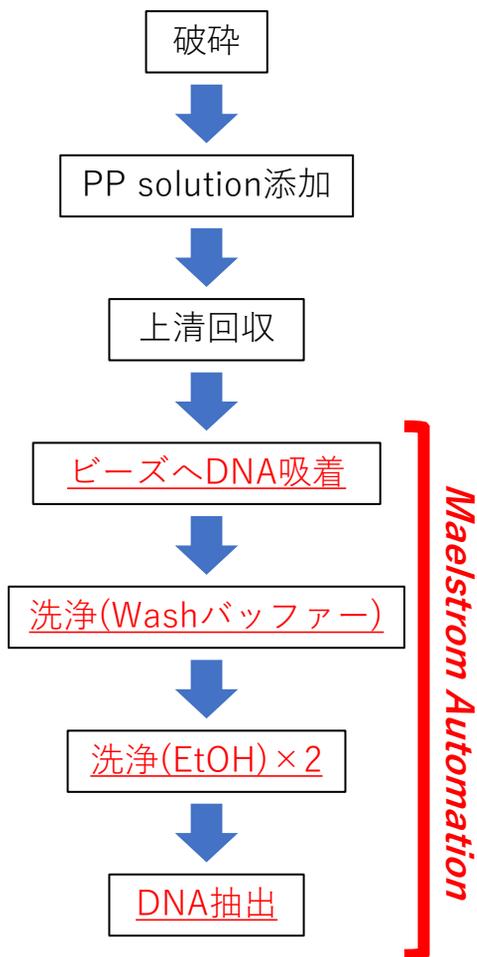
Extrap用吸着防止剤中の夾雑DNAは、最も少ないスキムミルクと比較しても1/400以下であり、微生物濃度が低いサンプルのDNA抽出にも適用可能。

まとめ

- ・Extrap用DNA吸着防止剤の真正細菌由来DNA含量は、スキムミルクと比較して、1/400以下 (2.6 copies/μL抽出液) であり、微生物濃度が低いサンプルのDNA抽出にも適用可能であることが確認された。
- ・Extrapは、DNA回収効率、PCR阻害物質除去効果ともに、他社キットと同等以上であることが確認された。
- ・Extrapを使用したとき、ボルテックスミキサーで破砕した場合でも、ビーズビーターを使用した場合と同等の結果が得られることが確認された。

Extrap Soil DNA Kit PlusのMaelstrom Switch 8による自動化検証実験

Extrapの工程9以降をTaiwan Advanced Nanotech社 (代理店 フナコシ)のMaelstrom Switch 8を用いてDNA自動抽出を行った。

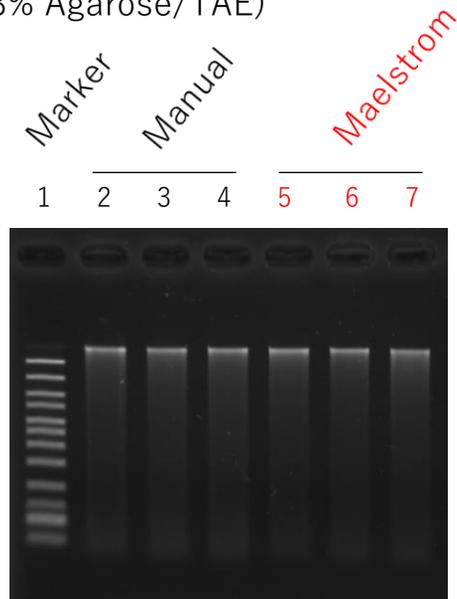


- 作業時間(工程9以降)
Manual : およそ45分
Maelstrom : およそ30分

○DNA回収量

	DNA収量(ng)
Manual	492
	525
	504
Maelstrom	691
	705
	761

- 電気泳動 (0.8% Agarose/TAE)



作業工程の短縮、収量の増加があり、純度の低下も認められなかった。
Extrapは自動化に適用可能