サトイモ土壌からの DNA 抽出と *Phytophthora colocasiae* の検出

1. Extrap Soil Kit Plus ver.2 による土壌からの DNA 抽出
2. *Ph. colocasiae* 特異的 primer を用いた PCR による検出
3. *Ph. colocasiae* 特異的 primer を用いたリアルタイム PCR による定量

1. Extrap Soil Kit Plus ver.2 による土壌からの DNA 抽出

➢ 用意するもの（主なもの）

Extrap Soil Kit Plus ver.2	日鉄住金環境(株)
70%エタノール	
TE buffer (溶出液)	
1.5 / 2ml チューブ	
マグネチックスタンド	Magical Trapper, TOYOBO
細胞粉砕装置	Micro Smash MS-100, トミーメディコ
ヒートブロック	
真空乾燥機	

- プロトコル

細胞破砕

① Bead Tubes に、土試料 0.5 g、Extraction Buffer 950 μL、Lysis Solution 50 μL を添加する。
② ボルテックスミキサーで 5 秒間撹拌する。
③ ビーズビーティング(4,200 rpm、30 秒間) 後、遠心 (14,000×g, 5 分, 4℃)

タンパク質除去

④ 上清 600 μL を 1.5 mL チューブに移し、PP Solution 300 μL を添加する。
⑤ ④のチューブを 10 回程度転倒混和し、撹拌する。
⑥ 遠心(14,000×g, 5 分, 4℃)
⑦ 上清 800 μL を 2 mL チューブに移す。

磁性ビーズによる精製

⑧ ⑦ のチューブに MBs Solution 50 μL、 Binding Solution 890 μL を添加する。
⑨ ⑧のチューブを 2 分間程度転倒混和し、よく撹拌する。
⑩ ⑨のチューブをスピンダウンし、マグネティックスタンドにセットする。
⑪ 1 分以上集磁したのち、マイクロピペットを使用して上清を除去する。
⑫ ⑪のチューブに Washing Solution 800μL を添加し、ボルテックスミキサー（低速）で十分に撹拌する。
⑬ ⑫ のチューブをスピンダウンし、マグネティックスタンドにセットして 1 分以上集磁したのち、マイクロピペットを使用して上清を除去する。
⑭ 70%エタノール溶液 1 mL を添加し、ボルテックスミキサー（低速）で十分に撹拌する。
⑮ ⑭ のチューブをスピンダウンし、マグネティックスタンドで 1 分以上集磁したのち、マイクロピペット を使用してエタノールを除去する。
⑯ ⑭～⑮ の工程を再度繰り返す。

DNA 溶出

⑰ 10 分間真空乾燥後 100μLTE バッファーを添加し，ボルテックスミキサー（低速）で十分に撹拌する。65℃で途中撹拌しながら 10 分加温。
⑱ ⑰ のチューブをスピンダウンし、マグネティックスタンドにチューブをセットして集磁したのち、磁性ビーズをとらないように注意しながら、すべての溶出液を新しいチューブに移す。

2. *Ph. colocasiae* 特異的 primer を用いた PCR による検出

Ph. colocasiae **特異的 primer**

PhyCol_For(1-2-2)　5'-GCTGACTTGGTGGTATTCTCTAG-3'

PhyCol_Rev(1-2-2)　5'-CACAAGGGAGTTGGCACAAC-3'

PCR reaction Mix

	1 反応あたり	Final conc.
DNA	5 μL	
SDW	11.875 μL	
BSA (4mg/ml)＊1	2.5 μL	0.4mg/ml
x10 Buffer Mag+ ＊2	2.5 μL	1×
dNTP (2.5 mM)　＊2	2 μL	0.2mM
Phy Col Pre(1-2-2)　(25μM)	0.5 μL	0.5μM
Phy Col Rev(1-2-2) (25μM)	0.5 μL	0.5μM
Takara Taq HS	0.125 μL	0.625U
Total	25 μL	

*1； 自家調製。下記のリアルタイム PCR マニュアルの調製方法を参照。

*2； 試薬 Takara Taq HS に添付されている。

Thermal condition

95℃	2 min	
94℃	30sec	40 cycle
64℃	30sec	40 cycle
72℃	30sec	40 cycle
72℃	10min	

反応後、Agarose S 3%ゲルで電気泳動してバンドを確認する。

3. *Ph. colocasiae* 特異的 primer を用いたリアルタイム PCR による定量

➢ 用意するもの（主なもの）

リアルタイム PCR 装置	StepOne Plus, Thermo Fisher Scientific 社
専用プレート	
TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)	Takara 長期保存する場合は、−20℃で保存。 いったん融解したものは 4℃、6 ヵ月保存。いずれも遮光下。
BSA (4mg/ml)	SIGMA 牛血清アルブミン(A-2153)を滅菌蒸留水で調製
Ph. colocasiae 特異的 primer	PhyCol_For(1-2-2)
	PhyCol_Rev(1-2-2)
標準菌株 DNA（検量線用）	（例）*Ph. colocasiae* P6317 株（1 fg～100 pg)の希釈系列
土壌抽出 DNA（サンプル）	（例）サトイモ土壌１～5

➢ プロトコル

① ソフトウェアの起動と実験条件を設定入力する。
StepOne Plus の場合、Quantitation Standard Curve
SYBER Green
Standard mode

Thermal condition

初期変性	95℃	30 秒	
2 Step PCR	95℃	5 秒	40 cycle
	64℃	1min	
Melting Curve	95℃	15sec	
	60℃	1min	
	95℃	15sec	

サンプル配置図
（例：検量線用の菌体 DNA を 2 反復、土壌サンプル DNA を 3 反復反応する場合）

	5	6	7	8
A	菌体 100pg	菌体 100pg	土壌 1	土壌 3
B	菌体 10 pg	菌体 10 pg	土壌 1	土壌 4
C	菌体 1 pg	菌体 1 pg	土壌 1	土壌 4
D	菌体 100 fg	菌体 100 fg	土壌 2	土壌 4
E	菌体 10 fg	菌体 10 fg	土壌 2	土壌 5
F	菌体 1 fg	菌体 1 fg	土壌 2	土壌 5
G	NC	NC	土壌 3	土壌 5
H			土壌 3	

② 下記の反応液の調製をする。
すべて**クリーンベンチ内**で、必ずディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止する。また、反応液調製時は、酵素失活防止のため試薬を**氷上(アイスラック)**に置く。

PCR reaction Mix

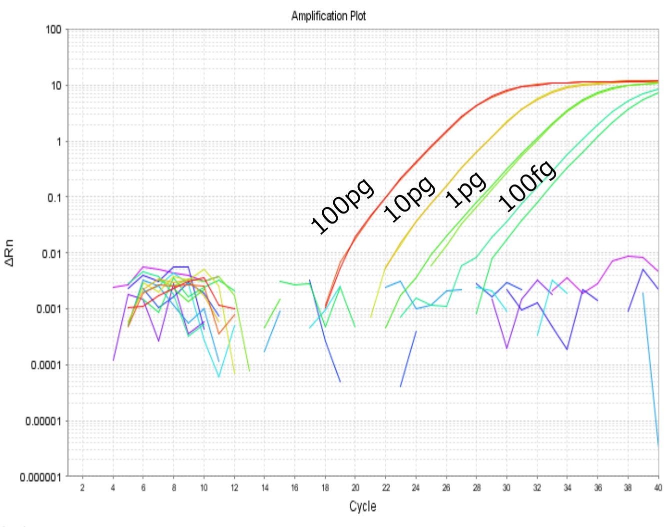
	1 反応あたり	Final conc.
SYBR Premix Ex Taq II	12.5μl	1×
BSA (4mg/ml)	2.5μl	0.4mg
ROX Reference Dye (50×)*3	0.5μl	1×
Forward Primer (25μM)	0.5μl	0.5μM
Reverse Primer (25μM)	0.5μl	0.5μM
SDW（滅菌蒸留水）/ 標準 DNA の場合	3.5μl / 7.5μl	
土壌抽出 DNA / 標準 DNA*4	5μl / 1μl	
Total	25μl	

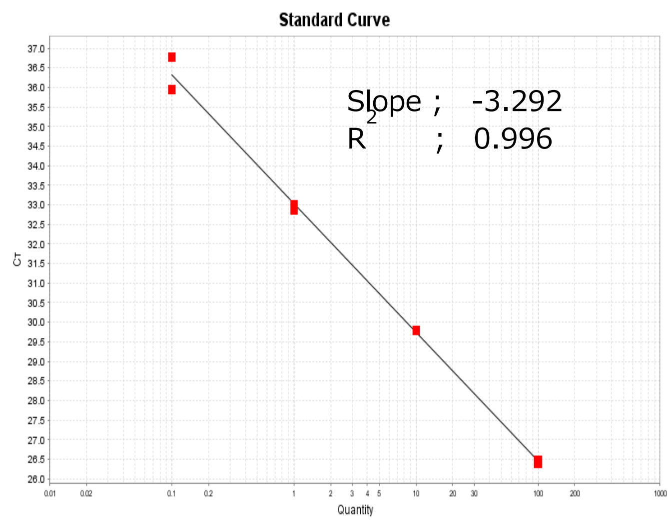
*3；ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用する。機種によって添加するものが違うので要確認。
*4；検量線は毎回作成する。

③ 分注後キャップをして反応プレートの準備完了。軽く遠心後、リアルタイム PCR 装置にセットし、反応を開始する。

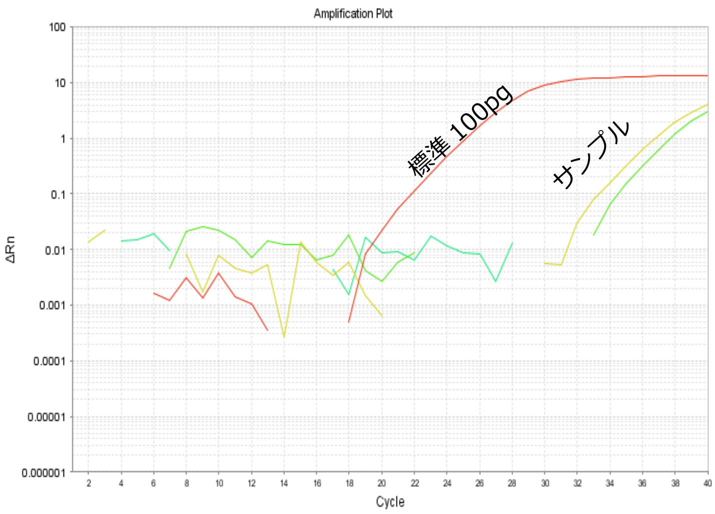
➢ データの解析＿定量方法について

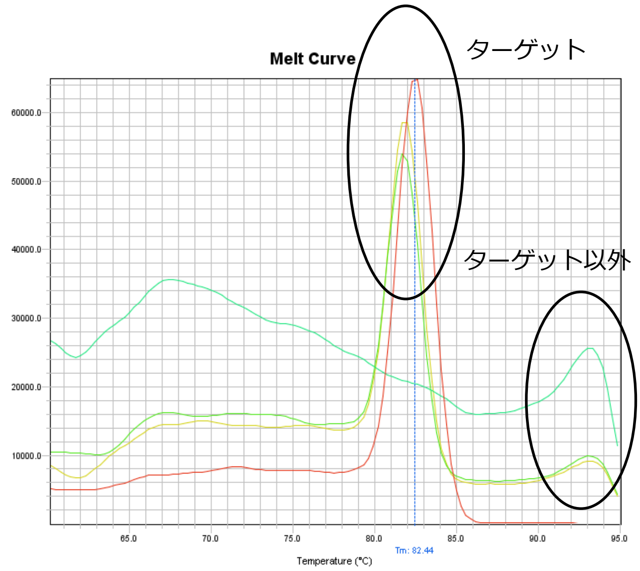
① 標準菌株の蛍光強度から検量線を作成する
傾き（参考として、100%の増幅効率の時-3.32）と相関係数（0.990 以上であることが望ましい）を確認する。はずれたポイントはソフト上で外す(omit)ことができる。





② 解離曲線からターゲットの PCR 産物が増幅したことを確認する
SYBER Green アッセイでは存在するすべての 2 本鎖 DNA が蛍光値に反映するため、土壌 DNA のようなクルードの DNA の場合は特に注意する必要がある。解離温度が異なる増幅産物は *colocasiae* 由来ではない。





③　サンプルの蛍光強度から検量線をもちいて定量値を得る(Step-One では自動算出)。土 1 g あたりの *colocasiae* DNA 量、および核の個数を算出する。

土 1 g あたりの *colocasiae* DNA 量 pg

= 土壌抽出 DNA 5 µl あたりの *colocasiae* DNA 量 pg　×20　/ 0.5

＊土壌 0.5 g から DNA を抽出し、溶出液 100 µL のうち 5 µL（1/20 量）を定量

土 1 g あたりの *colocasiae* 核の個数

=土 1 g あたりの *colocasiae* DNA 量 pg　/0.086

＊*colocasiae* 遊走子 1 個あたりの DNA 量　0.086 pg