



পানি থেকে মাছের eDNA সংগ্রহ ও প্রস্তুতি (Fish metabarcoding)

নদী, পুকুর, হাওর-বিল থেকে পানি সংগ্রহ, filtration বা centrifugation-এর মাধ্যমে eDNA ঘনীভূতকরণ এবং Fish Metabarcoding-এর জন্য filter বা pellet সংরক্ষণের নির্দেশিকা।

জলজ পরিবেশে উপস্থিত মাছের Environmental DNA (eDNA) সংগ্রহ, ঘনীভূতকরণ এবং পরবর্তী DNA extraction ও Fish Metabarcoding-এর জন্য উচ্চমানের filter বা eDNA pellet প্রস্তুতের ধাপসমূহ।

1. প্রয়োজনীয় উপকরণ

- Sterile water sampling bottle (3–5 L) ও sterile 50 mL Falcon tube
- Sterile gloves, permanent marker
- Ice box, ice pack ও cooler box
- GPS device বা মোবাইল GPS
- Filtration-এর জন্য: vacuum filtration unit / peristaltic pump / syringe filter, 0.45 μ m membrane filter, 5 μ m অথবা 20 μ m pre-filter, sterile forceps

2. Sampling site ও তথ্য সংরক্ষণ

প্রতিটি sampling site-এর জন্য লিখে রাখুন: Sample ID, location, GPS coordinate, তারিখ, সময়, পানির তাপমাত্রা এবং habitat type (নদী, পুকুর, হাওর, বিল, জলাধার ইত্যাদি)।

3. পানি নমুনা সংগ্রহ

- **Composite sample:** প্রতিটি site-এর বিভিন্ন অংশ (তীরবর্তী, মধ্যবর্তী ও অপেক্ষাকৃত গভীর অঞ্চল) থেকে পানি নিয়ে একটি composite sample তৈরি করুন, যাতে পুরো জলাশয়ের মাছের বৈচিত্র্য প্রতিনিধিত্ব করে।
- **পরিমাণ:** প্রতিটি site থেকে মোট 5 লিটার পানি।
- ভাসমান আবর্জনা এড়িয়ে চলুন। বোতল অবশ্যই sterile ও DNA-free হতে হবে। প্রতিটি sample-এর জন্য নতুন gloves ব্যবহার করুন।

4. সংরক্ষণ ও পরিবহন

সংগৃহীত পানি ice box-এ রাখুন এবং 4 °C-এ পরিবহন করুন। যত দ্রুত সম্ভব filtration বা centrifugation করুন; দেরি হলে -20 °C বা -80 °C-এ সংরক্ষণ করুন।

5. eDNA ঘনীভূতকরণ

Option A: Filtration (সুপারিশকৃত)

Fish eDNA metabarcoding-এ filtration সবচেয়ে বেশি ব্যবহৃত ও কার্যকর পদ্ধতি।

1. **Pre-filtration:** পানি ঘোলা, শৈবাল বা পলিমাটি সমৃদ্ধ হলে প্রথমে 20 μ m অথবা 5 μ m pre-filter দিয়ে বড় কণা সরিয়ে নিন।
2. **Membrane filtration:** এরপর vacuum filtration system-এ 0.45 μ m membrane filter দিয়ে ফিল্টার করুন।
3. **Filter সংগ্রহ:** sterile forceps দিয়ে filter membrane তুলে sterile microcentrifuge tube-এ রাখুন।
4. **সংরক্ষণ:** Longmire's buffer, RNAlater বা absolute ethanol-এ, অথবা সরাসরি -20 °C বা -80 °C-এ।

Filter membrane-এ মাছের eDNA, cellular debris ও ভাসমান জৈব কণা আটকে থাকবে, যা পরে DNA extraction-এ ব্যবহার হবে।

Option B: Centrifugation (filtration সুবিধা না থাকলে)

1. 5 লিটার পানি ভালোভাবে মিশিয়ে 50 mL করে sterile Falcon tube-এ ভাগ করুন (প্রায় 100টি টিউব)। প্রতিটি টিউবে Sample ID, site ও তারিখ লিখুন।
2. প্রতিটি টিউব 10,000–12,000 × g-এ 15–20 মিনিট, 4 °C-এ centrifuge করুন।
3. Supernatant সাবধানে ফেলে দিয়ে তলার pellet রাখুন।
4. একই site-এর সব টিউবের pellet একটি sterile tube-এ একত্র (pool) করে homogenize করুন।
5. চূড়ান্ত pellet –20 °C (স্বল্পমেয়াদি) বা –80 °C (দীর্ঘমেয়াদি)-এ রাখুন। বারবার freeze-thaw এড়িয়ে চলুন।

6. Contamination নিয়ন্ত্রণ

- Disposable gloves ও প্রতিটি sample-এর জন্য আলাদা sterile container ব্যবহার করুন।
- একটি field blank (sterile পানি, sample-এর মতোই process করা) রাখা উত্তম।
- কাজের জায়গা DNA decontamination solution বা 70% ethanol দিয়ে নিয়মিত পরিষ্কার করুন।
- প্রতিটি sample আলাদাভাবে পরিচালনা করুন।

সমস্যা	কারণ	সমাধান
Contamination	যন্ত্রপাতি, বোতল, মানুষের DNA	Gloves, sterile disposables, field blank
DNA degradation	রোদ (UV), তাপ, দেরি	দ্রুত filter করুন, ঠান্ডায় বা buffer-এ রাখুন
Filter বন্ধ হয়ে যাওয়া	ঘোলা পানি, শৈবাল	Pre-filter, একাধিক filter বা কম পানি
কম DNA	পাতলা বা পুরোনো নমুনা	বেশি পানি বা replicate sample

Questions before sending samples? WhatsApp / phone +880 1308-222824 · bdgenome@yahoo.com ·
bdgenomes.com/guides/edna-water-fish/