

土壌 DNA 抽出キット

ISOIL Large for Beads ver.2

マニュアル (第 2 版)

Code No. 312-06791

NIPPON GENE CO., LTD.

目次

I	製品説明	1
II	キット内容	1
III	保存	2
IV	使用上の注意	2
V	プロトコル	3
	<本品以外に必要な試薬、機器など>	3
	<標準プロトコル>	3
	<オプションプロトコル① 土壌 DNA の再精製>	5
	<オプションプロトコル② 微量な DNA を回収するためのスケールアップ>	6
VI	データ集	8
	1. 土壌サンプルからの DNA 抽出	8
	2. 土壌 DNA のスペクトル	8
	3. PCR による系統群の検出	9
	4. 土壌 DNA の再精製	10
VII	トラブルシューティング	11
VIII	関連製品	12

I 製品説明

ISOIL Large for Beads は 5 g の土壌サンプルから DNA を抽出するためのキットです。

特別な組成の抽出液により、非火山灰土壌はもちろん、これまで困難とされてきた火山灰土壌からも DNA の抽出が可能です。DNA の抽出は、界面活性剤存在下での加熱抽出と、Beads による物理的な菌体破碎を併用しています。また、特殊な条件下での DNA 沈殿により、従来の方法と比較して、高純度の土壌 DNA を高濃度で抽出することができます。

II キット内容

(8 回用)

Beads Tube	8 本
Lysis Solution BB	80 ml ×1 本
Lysis Solution 20 S*	4 ml ×1 本
Purification Solution*	45 ml ×1 本
Precipitation Solution	90 ml ×1 本
Wash Solution	45 ml ×1 本
TE (pH8.0)	10 ml ×1 本
Ethachinmate	100 μ l ×1 本
マニュアル	1 部

* Lysis Solution 20 S および Purification Solution 中に結晶が析出する場合がありますが、品質、性能に問題はありませぬ。このような場合には、容器ごと 37~65°C 程度でインキュベートし (ときおり混和する)、結晶を完全に溶解させてからご使用ください。

III 保存

ISOIL Large for Beads に含まれる試薬はすべて室温保存が可能です。

ただし、Precipitation Solution、Wash Solution、Ethachinmate については、使用時のコンタミネーション（カビや雑菌等の混入）に十分注意し、開封後は低温（2～10℃）で保存することをお奨めします。

IV 使用上の注意

- 本品は試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
- 試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱わないでください。
- 本品のお取り扱いは、マニュアル記載内容通りに行ってください。
- マニュアル記載内容と異なったお取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。
- 本品は、東京大学 TLO が所有する特許のライセンスを受けて製造販売しております。

V プロトコル

<本品以外に必要な試薬、機器など>

- ・ 70%エタノール
- ・ クロロホルム
- ・ メスピペット
- ・ マイクロピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ 遠沈管
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ インキュベーター
- ・ 遠心機

<標準プロトコル>

- ① 5 g の土壌サンプルを Beads Tube に入れる。
- ② 9.5 ml の Lysis Solution BB と 0.5 ml の Lysis Solution 20S を添加する。
- ③ 最高速度で 10 分間ボルテックスした後、65°C で 60 分間インキュベートする (注¹) (注²) (注³)。
- ④ 遠心 (4,000×g, 5 分間, 室温) する。
- ⑤ 上清 6 ml を新しい遠沈管に移し、4 ml の Purification Solution を添加し、十分に混合する (注⁴)。
- ⑥ 6 ml のクロロホルムを添加し、1 分間ボルテックスした後、遠心 (4,000×g, 15 分間, 室温) する (注¹)。
- ⑦ 中間層を入れないように注意しながら、水層 (上層) を新しい遠沈管に移し、等量の Precipitation Solution を添加して十分に混合し、遠心 (8,000×g, 60 分間, 4°C) する (注⁵) (注⁶)。
- ⑧ 上清を捨て、5 ml の Wash Solution を加えて沈殿および遠沈管の壁をリンスし、遠心 (8,000×g, 10 分間, 4°C) する (注⁶) (注⁷) (注⁸)。
- ⑨ 上清を捨て、5 ml の 70%エタノールと 10 μl の Ethachinmate を加えてボルテックスした後、遠心 (8,000×g, 10 分間, 4°C) する (注⁶) (注⁸) (注⁹)。
- ⑩ 上清を捨て、風乾した後、沈殿を適量 (0.3~1 ml 程度) の TE (pH8.0) に溶解する (注¹⁰)。

- (注1) 液漏れの原因となりますので、遠沈管の蓋がしっかり閉まっていることを確認してください。
- (注2) インキュベートの途中、転倒混和することで、土壌 DNA の収量が増加します。
- (注3) ボルテックスの代わりに、50 ml 遠沈管対応のビーズ式破碎装置を使用する場合は、ビーティングの時間を短縮することができます。条件（スピード、時間）は至適化してください。
- (注4) 土壌サンプルの水分含量が少ない場合（サンプルが乾燥している場合）、遠心（④）後の上清の容量が 6 ml よりも少なくなることがあります。このような場合は、遠心後の上清の容量：Purification Solution の容量：クロロホルムの容量が、3：2：3 となるようにして実験を進めます。この容量比は重要です。
- (注5) ④の遠心後の上清 6 ml、Purification Solution 4 ml、クロロホルム 6 mlの場合、遠心（⑥）後の水層（上層）は 8 ml 程度強となるので、中間層を入れないように注意しながら、8 ml を次のステップへ進めます。
- (注6) 弊社ではコンニカル型のディスパーザブル遠沈管と、対応の遠心ローターを使用して 8,000×g で 60 分間遠心しています。遠心力は必ずご使用の遠沈管の最大耐遠心力以下に設定してください。また、ご使用になる遠沈管にあわせて、遠心力および遠心時間を加減してください。
- (注7) 通常、この段階では DNA の沈殿は見えません。DNA が沈殿していると考えられるチューブ壁をピペット等で触らないように注意してください。沈殿は⑨で Ethachinmate を加えボルテックスした後で可視化されます。
- (注8) できるだけ上清を取り除いてください。上清に含まれる着色物質（腐植物質）は PCR を阻害することが知られています。また、腐植物質のコンタミネーションが少ない場合（クロロホルム処理後の水層の着色が少ない場合）は、⑧の操作を省略しても構いません。
- (注9) 70%エタノールに Ethachinmate を加えることで、土壌 DNA を安定して回収できます。
- (注10) 得られた土壌 DNA に着色が残っている場合や PCR 阻害がみられる場合は、後述のオプションプロトコル①で土壌 DNA の再精製を行ってください。

<オプションプロトコル① 土壌 DNA の再精製>

土壌 DNA に着色が残っている場合や、PCR 阻害がみられる場合は、下記のプロトコルで DNA の再精製を行う。

- ① 標準プロトコル及びオプションプロトコル②で得られた土壌 DNA 300 μ l を新しい 1.5 ml チューブに移し、200 μ l の Purification Solution を添加し、十分に混合する。
- ② 300 μ l のクロロホルムを添加し、15 秒間ボルテックスした後、遠心 (12,000 \times g, 15 分間, 室温) する。
- ③ 中間層を入れないように注意しながら水層 (上層) 400 μ l を新しい 1.5 ml チューブに移し、400 μ l の Precipitation Solution を添加して十分に混合し、遠心 (20,000 \times g, 10 分間, 4 $^{\circ}$ C) する。
- ④ 上清を捨て、500 μ l の Wash Solution を加えて沈殿およびチューブ壁をリンスし、遠心 (20,000 \times g, 10 分間, 4 $^{\circ}$ C) する (注1) (注2)。
- ⑤ 上清を捨て、500 μ l の 70%エタノールと 1 μ l の Ethachinmate を加えてボルテックスした後、遠心 (20,000 \times g, 5 分間, 4 $^{\circ}$ C) する (注2) (注3)。
- ⑥ 上清を捨て、風乾した後、沈殿を適量 (100~300 μ l 程度) の TE (pH8.0) に溶解する。

(注1) 通常、この段階では DNA の沈殿は見えません。DNA が沈殿していると考えられるチューブ壁をピペットチップで触らないように注意してください。沈殿は⑤で Ethachinmate を加えボルテックスした後で可視化されます。

(注2) できるだけ上清を取り除いてください。上清に含まれる着色物質 (腐植物質) は PCR を阻害することが知られています。また、腐植物質のコンタミネーションが少ない場合 (クロロホルム処理後の水層の着色が少ない場合) は、④の操作を省略しても構いません。

(注3) 70%エタノールに Ethachinmate を加えることで、土壌 DNA を安定して回収することができます。

<オプションプロトコル② 微量な DNA を回収するためのスケールアップ>

土壌サンプルに含まれる微生物の量が少なく、5 g の土壌サンプルからでは、解析に十分な DNA の回収が難しいと考えられる場合は、下記のプロトコルで 20 g のサンプルから DNA を抽出する。

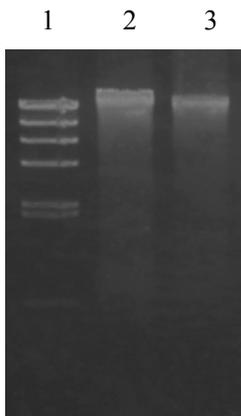
- ① 土壌サンプルを 5 g ずつ、4 本の Beads Tube に入れる。(計 20 g)
- ② 各チューブに、9.5 ml の Lysis Solution BB と 0.5 ml の Lysis Solution 20S を添加する。
- ③ 最高速度で 10 分間ボルテックスした後、65℃で 60 分間インキュベートする (注1) (注2) (注3)。
- ④ 遠心 (4,000×g, 5 分間, 室温) する。
- ⑤ 沈殿を入れないように注意しながら、上清を 6 ml ずつ新しい 50 ml チューブ 4 本に移し、各チューブに 4 ml の Purification Solution を添加し十分に混合する (注4)。
- ⑥ 各チューブに 6 ml のクロロホルムを添加し、1 分間ボルテックスした後、遠心 (4,000×g, 15 分間, 室温) する (注1)。
- ⑦ 中間層を入れないように注意しながら、水層 (上層) を 2 本分ずつ新しい 50 ml チューブに移し、各チューブに等量の Precipitation Solution を添加して十分に混合し、遠心 (8,000×g, 60 分間, 4℃) する (注5) (注6)。(4 本のチューブを 2 本にまとめる)。
- ⑧ 上清を捨て、各チューブに 5 ml の Wash Solution を加えて沈殿および遠沈管の壁をリンスし、遠心 (8,000×g, 10 分間, 4℃) する (注6)、(注7)、(注8)。
- ⑨ 上清を捨て、各チューブに 5 ml の 70%エタノールと 10 μl の Ethachinmate を加えてボルテックスした後、遠心 (8,000×g, 10 分間, 4℃) する (注6)、(注8)、(注9)。
- ⑩ 上清を捨て、風乾した後、沈殿を適量 (0.3~1 ml 程度) の TE (pH8.0) に溶解する (注10)。

- (注1) 液漏れの原因となりますので、遠沈管の蓋がしっかり閉まっていることを確認してください。
- (注2) インキュベートの途中、転倒混和することで、土壌 DNA の収量が増加します。
- (注3) ボルテックスの代わりに、50 ml 遠沈管対応のビーズ式破碎装置を使用する場合は、ビーティングの時間を短縮することができます。条件（スピード、時間）は至適化してください。
- (注4) 土壌サンプルの水分含量が少ない場合（サンプルが乾燥している場合）、遠心（④）後の上清の容量が 6 ml よりも少なくなることがあります。このような場合は、遠心後の上清の容量：Purification Solution の容量：クロロホルムの容量が、3：2：3 となるようにして実験を進めます。この容量比は重要です。（④の遠心後の上清が多い場合、7.5 ml 程度とれることもあります。）
- (注5) ④の遠心後の上清 6 ml、Purification Solution 4 ml、クロロホルム 6 mlの場合、遠心（⑥）後の水層（上層）は 8 ml 程度強となるので、中間層を入れないように注意しながら、16 ml（2 本分）ずつを新しい 50 ml チューブへ移します。
- (注6) 弊社ではコニカル型のディスパーザブル遠沈管と、対応の遠心ローターを使用して 8,000×g で 60 分間遠心しています。遠心力は必ずご使用の遠沈管の最大耐遠心力以下に設定してください。また、ご使用になる遠沈管にあわせて、遠心力および遠心時間を加減してください。
- (注7) 通常、この段階では DNA の沈殿は見えません。DNA が沈殿していると考えられるチューブ壁をピペット等で触らないように注意してください。沈殿は⑨で Ethachinmate を加えボルテックスした後で可視化されます。
- (注8) できるだけ上清を取り除いてください。上清に含まれる着色物質（腐植物質）は PCR を阻害することが知られています。また、腐植物質のコンタミネーションが少ない場合（クロロホルム処理後の水層の着色が少ない場合）は、⑧の操作を省略しても構いません。
- (注9) 70%エタノールに Ethachinmate を加えることで、土壌 DNA を安定して回収できます。
- (注10) 得られた土壌 DNA に着色が残っている場合や PCR 阻害がみられる場合は、前述のオプションプロトコル①で土壌 DNA の再精製を行ってください。

VI データ集

1. 各種土壌サンプルからの DNA 抽出

本キットを用いて 2 種類の土壌から DNA 抽出を行った結果、いずれの土壌からも DNA を抽出することができた。



Lane 1. OneSTEP Marker 1 (λ /HindIII digest)

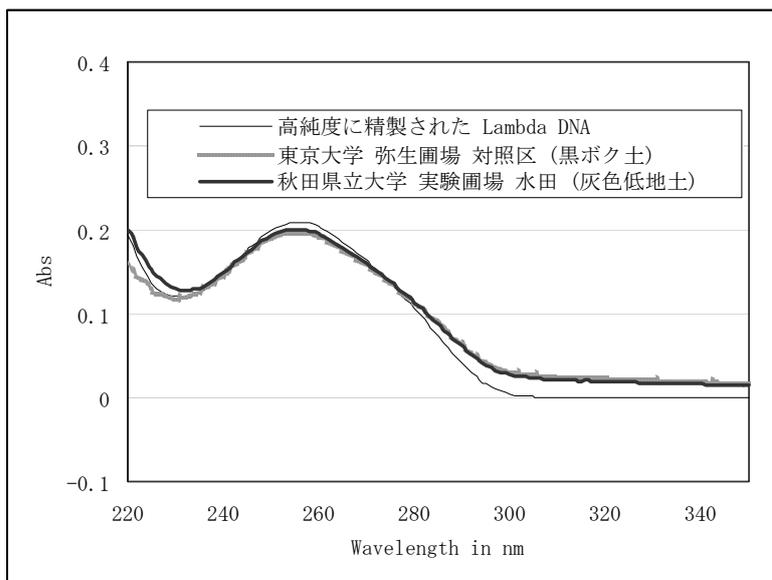
Lane 2. 東京大学 弥生圃場 対照区土壌
(黒ボク土 / 火山灰土壌)

Lane 3. 秋田県立大学 実験圃場 水田土壌
(灰色低地土 / 非火山灰土壌)

5 g の土壌から抽出した DNA の 1/200 量を 1% Agarose S ゲルで電気泳動した。

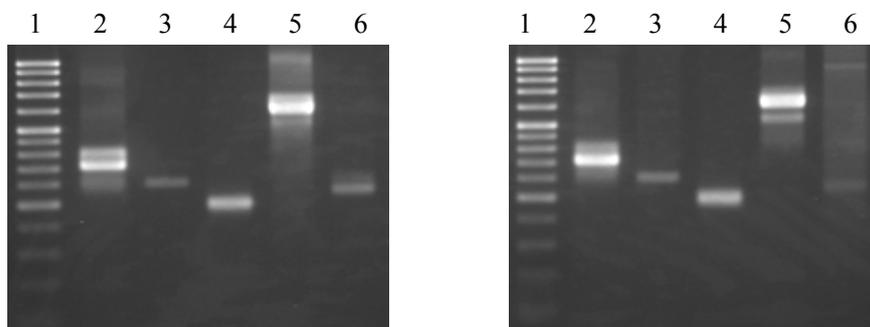
2. 土壌 DNA の吸収スペクトル

本キットを用いて抽出した土壌 DNA と高純度に精製された Lambda DNA (Code No.318-00414) の吸収スペクトルを比較した。



3. PCR による系統群の検出

系統群検出用プライマーを用いて、本キットで抽出した土壌 DNA の PCR 解析を行った結果、様々な系統群由来の DNA 断片が検出された。



東京大学 弥生圃場 対照区土壌
アロフェン質黒ボク土

秋田県立大学 実験圃場 水田土壌
灰色低地土

- Lane 1. OneSTEP Ladder 100 (0.1~2 kb)
- Lane 2. Bacteria (723 bp)
- Lane 3. *Bacillus* species and relatives (600 bp)
- Lane 4. High-G+C gram-positive bacteria (542 bp)
- Lane 5. *Streptomyces* species and related taxa (1,243 bp)
- Lane 6. Fungi, protists, and green algae (555 bp)

PCR 産物の一部を 2% Agarose S ゲルで電気泳動した。

プライマー参考文献：

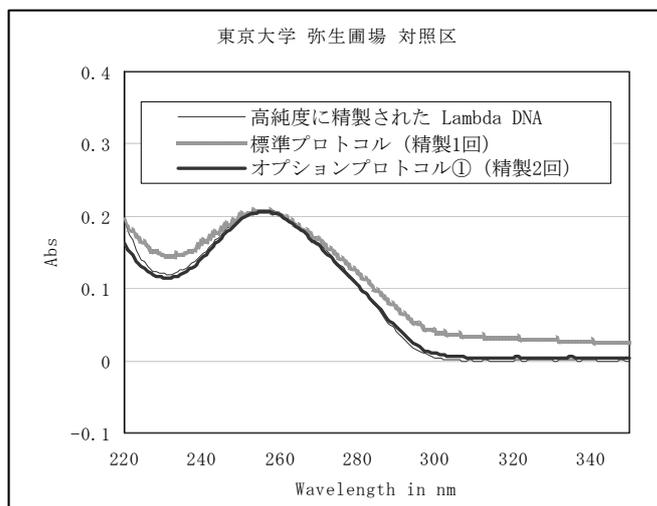
Small-Scale DNA Sample Preparation Method for Field PCR Detection of Microbial Cells and Spores in Soil.

Kuske CR, Banton KL, Adorada DL, Stark PC, Hill KK, Jackson PJ.

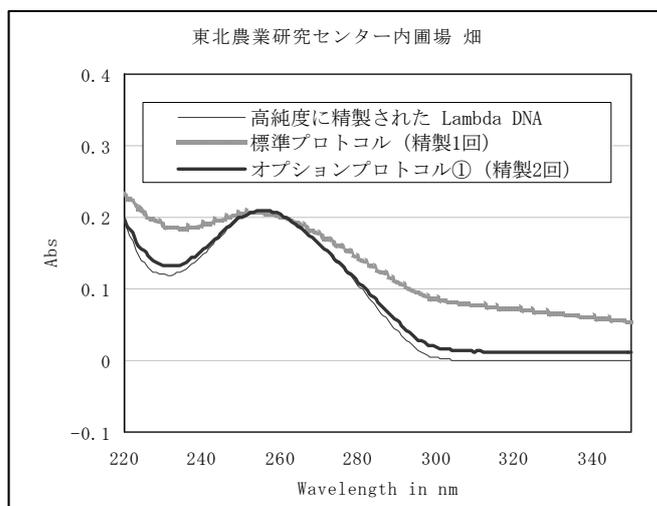
Appl Environ Microbiol. 1998 Jul 1;64(7):2463-72.

4. 土壌 DNA の再精製

腐植物質を多く含む黒ボク土から「標準プロトコル」で精製した土壌 DNA を、「オプションプロトコル① 土壌 DNA の再精製」で再精製し、吸光スペクトルを比較した。



標準プロトコルで精製した土壌 DNA には、やや着色が見られたが、オプションプロトコル①で再精製することで、無色透明な溶液になった。



標準プロトコルで精製した土壌 DNA には薄い茶色の着色が見られたが、オプションプロトコル①で再精製することで、無色透明な溶液になった。

再精製を行うことにより、いずれの土壌 DNA もより高純度に精製することができた。また、この再精製における DNA の回収率は 70%前後であった。

VII トラブルシューティング

問題	考えられる原因	考えられる対策
土壌 DNA の収量が少ない。	土壌微生物が少ない。	できるだけ新鮮な土壌を使用してください。
	DNA の沈殿が流れている。	プロトコルステップ⑨では DNA の沈殿が剥がれやすい状態になっています。70%エタノールと共に付属の Ethachinmate を使用してください。また、Ethachinmate により沈殿は可視化されますので、沈殿を流してしまわないように目で確認しながら注意深く上清を取り除いてください。
	Lysis Solution BB の濃度が最適ではない。	灰色低地土や褐色森林土等、DNA を吸着しないようないくつかの土壌については、Lysis Solution BB の代わりに、蒸留水で2倍に希釈した Lysis Solution BB を使用することで、DNA の収量が増加することがわかっています。
土壌 DNA の分子量が小さい。	Beads 破碎の物理的衝撃により DNA がせん断されている。	高分子土壌 DNA を抽出したい場合には界面活性剤下での加熱抽出法を採用している ISOIL を使用してください。
Lysis Solution BB、Lysis Solution 20S、Purification Solution 中に結晶が析出している。	低温によって試薬が析出している。	37~65℃程度でインキュベートし、結晶を完全に溶解させてからご使用ください。品質、性能には問題ありません。
Precipitation Solution 中に浮遊物が見られる。	カビ等のコンタミが起きている。	新しいキットをご購入ください。 本溶液はカビ等が繁殖しやすい溶液組成となっていますので、使用時のコンタミネーションには十分注意し、開封後は低温（2~10℃）で保存することをお奨めします。
Wash Solution 中に浮遊物が見られる。	カビ等のコンタミが起きている。	新しいキットをご購入ください。 ただし、腐植物質のコンタミネーションが少ない場合は標準プロトコル及びオプションプロトコルのステップ⑧は省略しても構いませんので、その場合には Wash Solution は必要ありません。 また、本溶液はカビ等が繁殖しやすい溶液組成となっていますので、使用時のコンタミネーションには十分注意し、開封後は低温（2~10℃）で保存することをお奨めします。
Ethachinmate 中に浮遊物が見られる。	カビ等のコンタミが起きている。	新しい Ethachinmate をご購入ください。 ただし、DNA の収量を特に気にしない場合には Ethachinmate は必要ありません。 また、使用時のコンタミネーションには十分注意し、開封後は低温（2~10℃）で保存することをお奨めします。

土壌は様々な鉱物、粘土などの無機物、様々な植物および植物遺体、腐植物質をはじめとする土壌有機物、そしてそこに生息する多様な微生物から成り立っています。そのため、一つとして同じ土壌はないと言えます。

本キットは現在までの試験の結果、日本の数十種類の様々なタイプの土壌から DNA が抽出できることを確認していますが、土壌は極めて多様なサンプルであることから、土壌の種類や状態によっては収量が上がらない可能性があります。

本キットで抽出した土壌 DNA の収量が少ない場合、試薬や操作上の問題だけでなく、土壌サンプルが他にはない特異な性質を有している可能性も考慮してください。

VIII 関連製品

コード No.	製品名	包装単位
316-06211	ISOIL	50 回用
319-06201	ISOIL for Beads Beating	50 回用
312-01791	Ethachinmate	0.2 ml

マニュアル記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

お問い合わせ先

株式会社ニッポンジーン
研究試薬部 学術営業課

TEL 076 - 451 - 6548
www.nippongene.com

お問い合わせは、お電話もしくは WEB フォームより
承っております