

土壌 DNA 抽出キット

ISOIL

マニュアル (第 3 版)

Code No.316-06211

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	2
	<本品以外に必要な試薬、機器など>	2
	<標準プロトコル>	3
	<スケールアップについて>	4
VI	データ集	5
	1. 各種土壌サンプルからの DNA 抽出	5
	2. 土壌 DNA のサイズ	5
	3. PCR による系統群の検出	6
	4. 土壌 DNA の制限酵素消化	6
	5. 65°C インキュベート中の攪拌と土壌 DNA の収量	7
	6. 土壌 DNA の PCR-DGGE 解析	7
VII	トラブルシューティング	8
VIII	関連製品	10

I 製品説明

ISOIL は土壌サンプルから 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。

ISOIL では DNA の抽出方法として界面活性剤存在下での加熱抽出法を採用しています。物理的な力を加えることなく土壌中の DNA を抽出するため、高分子の DNA を得ることができます。したがって、ISOIL で抽出した土壌 DNA は、メタゲノムライブラリーの構築等、遺伝子資源としての利用に適しています。

ただし、強固な細胞壁を持つ微生物等は破碎されない可能性がありますので、あらかじめご了承ください。

PCR-DGGE 解析等を用いた土壌微生物の群集構造解析および土壌 DNA の定量による土壌バイオマスの推定等には、ビーズ破碎法による ISOIL for Beads Beating をご使用ください。

II キット内容

Lysis Solution HE	50 ml × 1 本
Lysis Solution 20S*	1.25 ml × 2 本
Purification Solution*	20 ml × 1 本
Precipitation Solution	40 ml × 1 本
Wash Solution	50 ml × 1 本
TE (pH8.0)	5 ml × 1 本
Ethachinmate	100 μ l × 1 本
マニュアル	1 部

* : Lysis Solution 20S 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ん。このような場合には、容器ごと 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 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、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
- ・ マイクロピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ 2ml マイクロチューブ
- ・ インキュベーター
- ・ マイクロ遠心機
- ・ ボルテックスミキサー

<標準プロトコル>

- ① 0.5 g の土壌サンプルを 2 ml チューブに入れる。
- ② 950 μ l の Lysis Solution HE と 50 μ l の Lysis Solution 20S を添加し、転倒混和にて十分に混合した後、65°C で 1 時間インキュベートする^(注1)。
- ③ 遠心 (12,000 \times g, 1 分間, 室温) する。
- ④ 上清 600 μ l を新しいチューブに移し、400 μ l の Purification Solution を添加し、十分に混合する。
- ⑤ 600 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。
- ⑥ 中間層を入れないように注意しながら水層 800 μ l を新しいチューブに移し、800 μ l の Precipitation Solution を添加して十分に混合し、遠心 (20,000 \times g, 15 分間, 4°C) する^(注2)。
- ⑦ 上清を捨て、1ml の Wash Solution を加えて数回転倒混和し、遠心 (20,000 \times g, 10 分間, 4°C) する^(注2)、^(注3)。
- ⑧ 上清を捨て、1ml の 70%エタノールと 2 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°C) する^(注2)、^(注4)。
- ⑨ 上清を捨て、風乾した後、沈殿を 100 μ l の TE (pH8.0) に溶解する。

(注1) 途中で転倒混和することで、土壌 DNA の収量が増加します (データ集 5 参照)。ローテーター等が準備できる場合には、穏やかに回転させながらインキュベートすることをお奨めします。

(注2) ご使用の遠心機の最大遠心力が 20,000 \times g よりも小さい場合は、遠心機の最大遠心力 (ただし 12,000 \times g 以上) で遠心してください。

(注3) できるだけ上清を取り除いて下さい。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、⑦の操作を省略しても構いません。

(注4) 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。ただし、何らかの理由で Ethachinmate を添加されない場合は、ボルテックスを避け、転倒混和によって穏やかに沈殿を洗浄してください。

<スケールアップについて>

ISOIL での土壌 DNA 抽出はスケールアップが容易です。クローニングやライブラリーの構築等、高分子の土壌 DNA が大量に必要な場合には、スケールアップして抽出することをお奨めします。スケールアップの際には以下の点に注意してください。

1. Lysis Solution HE と Lysis Solution 20S の比は必ず 95 : 5 にする。
2. 標準プロトコル④の遠心上清と Purification Solution の比は必ず 6 : 4 にする。
3. クロロホルムの添加量は標準プロトコル④の遠心上清と等量にする。
4. Precipitation Solution の添加量はクロロホルム処理後に回収した水層の量と等量にする。

スケールアップ例：土壌 5g からの DNA 抽出 (10 倍スケール)

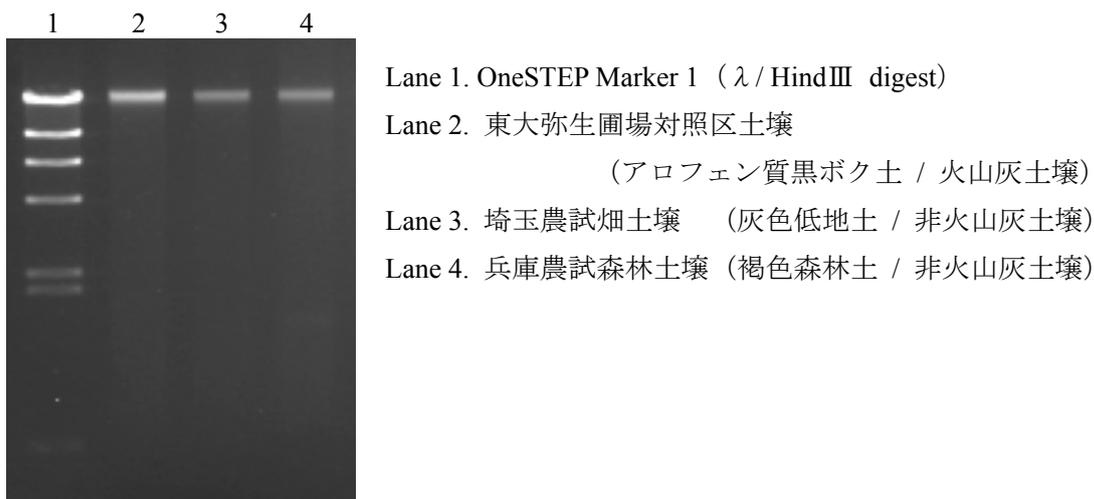
- ① 5g の土壌サンプルを 50ml 遠心チューブに入れる。
- ② 9.5ml の Lysis Solution HE と 0.5ml の Lysis Solution 20S を添加し、転倒混和にて十分に混合した後、穏やかに振とうしながら 65°C で 1 時間インキュベートする。
- ③ 遠心 (5,000×g, 10 分間, 25°C) する。
- ④ 上清 6ml を新しいチューブに移し、4ml の Purification Solution を添加し、十分に混合する。
- ⑤ 6ml のクロロホルムを添加し、転倒混和にて均一になるまで十分に混合した後、遠心 (5,000×g, 15 分間, 4°C) する。
- ⑥ 中間層を入れないように注意しながら水層 8ml を新しいチューブに移し、8ml の Precipitation Solution を十分に混合し、遠心 (9,000×g, 30 分間, 4°C) する。
- ⑦ 上清を捨て、10ml の Wash Solution を加えて数回転倒混和し、遠心 (9,000×g, 10 分間, 4°C) する。
- ⑧ 上清を捨て、10ml の 70%エタノールと 10 μl の Ethachinmate を加えて転倒混和した後、遠心 (9,000×g, 10 分間, 4°C) する^(注1)。
- ⑨ 上清を捨て、風乾した後、沈殿を 500 μl の TE (pH8.0) に溶解する。

(注1) Ethachinmate は最終溶液 100 μl に対して 1~2 μl で十分です。Ethachinmate を添加しすぎると溶液の粘度が増し、以後の操作に支障をきたす場合があります。

VI データ集

1. 各種土壌サンプルからの DNA 抽出

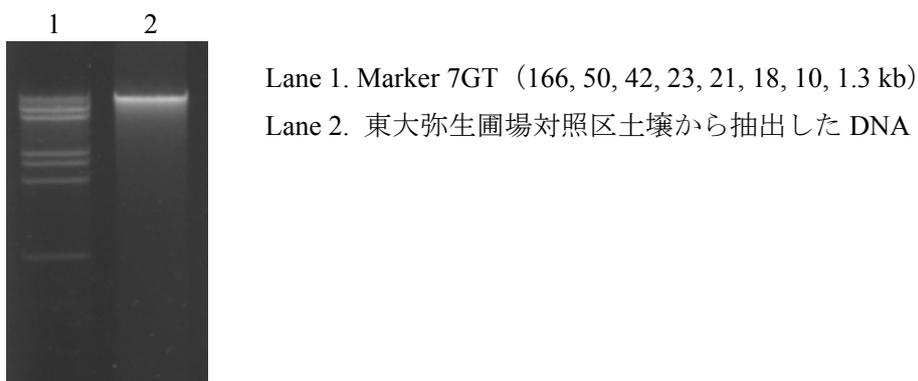
本キットを用いて 3 種類の土壌から DNA 抽出を行った結果、いずれの土壌からも DNA を抽出することができた。



0.5g の土壌から抽出した DNA の 1/10 量を 1% Agarose S で電気泳動した。

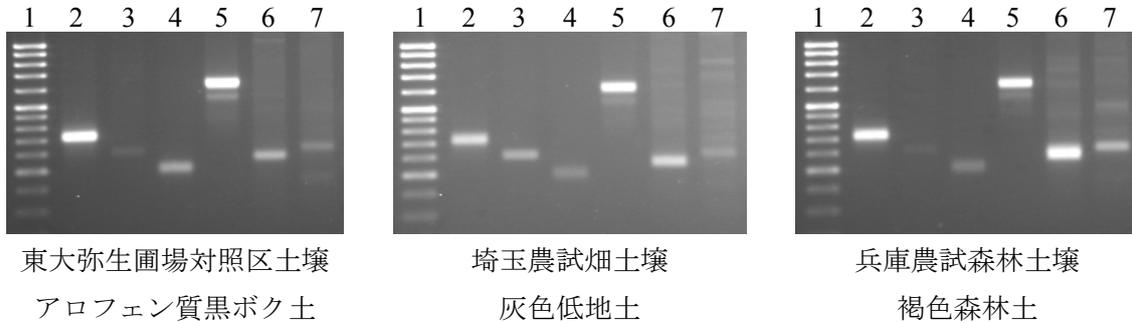
2. 土壌 DNA のサイズ

本キットを用いて抽出した土壌 DNA を 0.5% Agarose H で電気泳動した。その結果、抽出された土壌 DNA は 50kb 以上であった。



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。



Lane 1. OneSTEP Ladder 100

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)

Lane 7. Plants(597 bp)

PCR 産物の一部を 2% Agarose S で電気泳動。

プライマー参考文献：

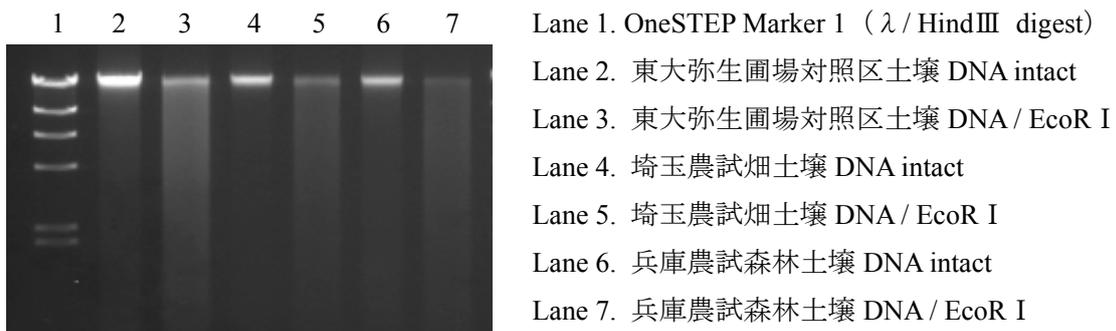
Small-Scale DNA Sample Preparation Method for Field PCR Detection of Microbial Cells and Spores in Soil.

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

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

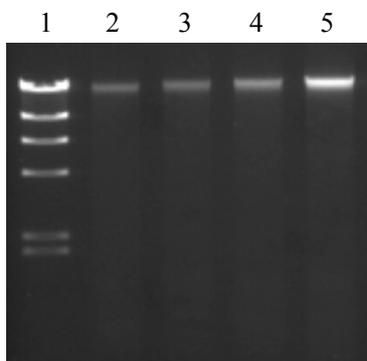
4. 土壌 DNA の制限酵素消化

本キットで抽出した土壌 DNA を制限酵素 EcoR I で消化した。



5. 65°Cインキュベート中の攪拌と土壌 DNA の収量

65°Cインキュベート中の攪拌と土壌 DNA の収量について検討した結果、インキュベート中に転倒混和することで DNA の収量が上がるのがわかった。



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

Lane 2. 60 分間静置

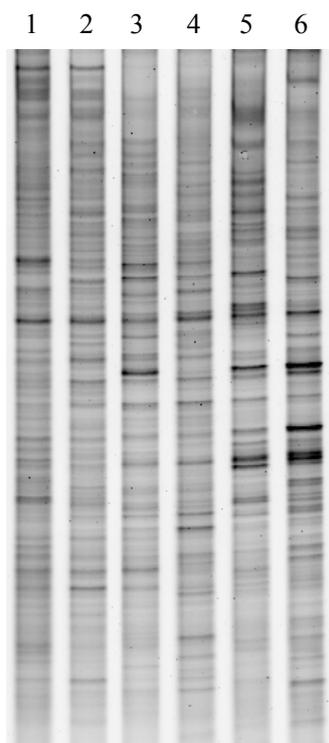
Lane 3. 30 分間隔で転倒混和

Lane 4. 20 分間隔で転倒混和

Lane 5. 10 分間隔で転倒混和

6. 土壌 DNA の PCR-DGGE 解析

本キットで抽出した土壌 DNA を用いて PCR-DGGE 解析を行った。



Lane 1. 東大弥生圃場対照区土壌

Lane 2. 東大田無農場牧草地土壌

Lane 3. 千葉農試森林土壌

Lane 4. 草地試験場永年採草地土壌

Lane 5. 埼玉農試畑土壌

Lane 6. 兵庫農試森林土壌

データ提供：

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 頼泰樹 博士

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。 また、65°Cでのインキュベートの際に、10 分間隔で溶液を転倒混和することで DNA 収量が増す場合があります（データ集 5 参照）。
	DNA の沈殿が流れている。	プロトコルステップ⑧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。
	微生物が十分に破碎されていない。	Beads Beating による物理的な菌体破碎を採用している ISOIL for Beads Beating をご使用ください。ただし、物理的なせん断を受けるため、抽出される土壌 DNA は～23 kb 程度となります。
DNA がせん断されている。	ピペット操作や攪拌時に物理的せん断が起きている。	ピペットチップの先端をカットしてください。また、溶液を攪拌する際はボルテックスの使用を避け、転倒混和で十分に混合してください。
Lysis Solution 20S 中に白い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°C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。
Purification Solution 中に白い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°C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な注意が必要です。開封後は低温（2～10°C）で保存することをお奨めします。

問題	考えられる原因	考えられる対策
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プロトコルステップ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な注意が必要です。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。 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
319-06201	ISOIL for Beads Beating	50 回用
312-06791	ISOIL Large for Beads ver.2	8 回用
318-06271	ISOFECAL	50 回用
315-06281	ISOFECAL for Beads Beating	50 回用
312-01791	Ethachinmate	0.2 ml
315-03981	Marker 7 GT (T4 GT7+T4 GT7/Bgl I)	10 μ g
310-05251	OneSTEP Marker 1 (λ /HindIII digest)	1,500 μ l
313-05241	OneSTEP Ladder 100 (0.1-2.0 kbp)	500 μ l
312-01193	Agarose S	100 g
319-01201	Agarose H	10 g
318-03231	Gene Taq NT	250 units

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