

土壤 DNA 抽出キット

---

---

ISOIL Large for Beads  
マニュアル（第 1 版）

---

---

Code No. 316-06331

NIPPON GENE CO., LTD.



目次
----

製品説明	1
キット内容	1
保存	2
使用上の注意	2
プロトコル	2
<本品以外に必要な試薬、機器など>	2
<プロトコル>	3
データ集	4
1．土壌サンプルからの DNA 抽出	4
2．土壌 DNA のスペクトル	4
3．PCR による系統群の検出	5
トラブルシューティング	6
関連製品	7

## 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。

ISOIL Large for Beads 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と Beads による物理的な菌体破碎法を併用しています。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、純度の高い土壌 DNA を高濃度で調製することができます。

土壌中の微生物が少ないことが予想される土壌サンプルからの DNA 抽出や、大量の土壌 DNA が必要な場合に最適なキットです。

## II キット内容

Beads Tubes	6 本
Lysis Solution BB *	60 ml × 1 本
Lysis Solution 20 S *	3 ml × 1 本
Purification Solution *	24 ml × 1 本
Precipitation Solution	48 ml × 1 本
Wash Solution	30 ml × 1 本
TE (pH8.0)	6 ml × 1 本
Ethachinmate	60 µl × 1 本
マニュアル	1 部

- \* Lysis Solution BB、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ん。このような場合には、容器ごと 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下さい。

### 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下さい。
- ・ 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。
- ・ ISOIL Large for Beads における土壌 DNA 抽出法は東京大学 TLO が特許出願中です。ニッポンジーンは土壌 DNA 抽出法に関して東京大学 TLO よりライセンスを受けています。

### 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

## <プロトコル>

5 g の土壌サンプルを Beads Tube に入れる。

9.5 ml の Lysis Solution BB と 0.5 ml の Lysis Solution 20 S を添加する。

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<sup>1</sup>)(注<sup>2</sup>)

遠心 (4K × g, 5 分間, 室温) する。

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。

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 (4K × g, 15 分間, 室温) する。(注<sup>1</sup>)

中間層を入れないように注意しながら水層 8 ml を新しい遠沈管に移し、8 ml の Precipitation Solution を添加して十分に混合し、遠心 (8K × g, 60 分間, 4 °C) する。(注<sup>3</sup>)

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 (8K × g, 10 分間, 4 °C) する。(注<sup>3</sup>)(注<sup>4</sup>)

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 (8K × g, 10 分間, 4 °C) する。(注<sup>3</sup>)(注<sup>4</sup>)(注<sup>5</sup>)

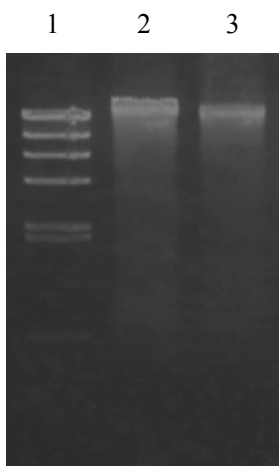
上清を捨て、風乾した後、沈殿を適量 (0.5 ml ~ 1 ml 程度) の TE (pH8.0) に溶解する。

- (注<sup>1</sup>) 遠沈管の蓋がしっかり閉まっていることを確認して下さい。蓋のゆるみは液漏れの原因となります。
- (注<sup>2</sup>) 途中で何度か転倒混和することで、土壌 DNA の収量が増加します。
- (注<sup>3</sup>) 弊社ではコニカル型のディスポーザブル 50 ml 遠沈管と、コニカル型遠沈管対応の遠心ローターを使用して 8K × 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下さい。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下さい。
- (注<sup>4</sup>) 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、この操作を省略しても構いません。
- (注<sup>5</sup>) 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。

## 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 ( / *Hind* digest )

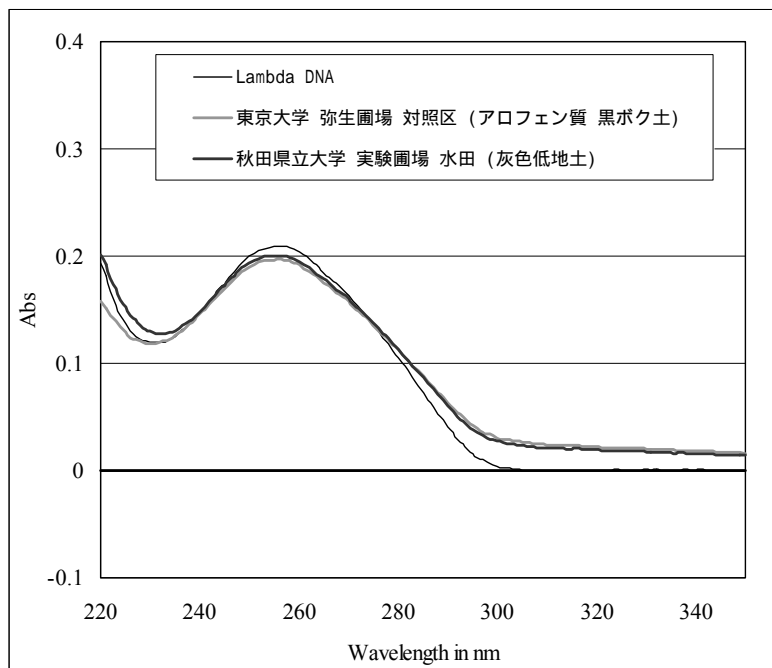
Lane 2. 東京大学 弥生圃場 対照区土壌  
(アロフェン質黒ボク土 / 火山灰土壌)

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 / 100 量を 1% Agarose S で電気泳動した。

### 2. 土壌 DNA の吸収スペクトル

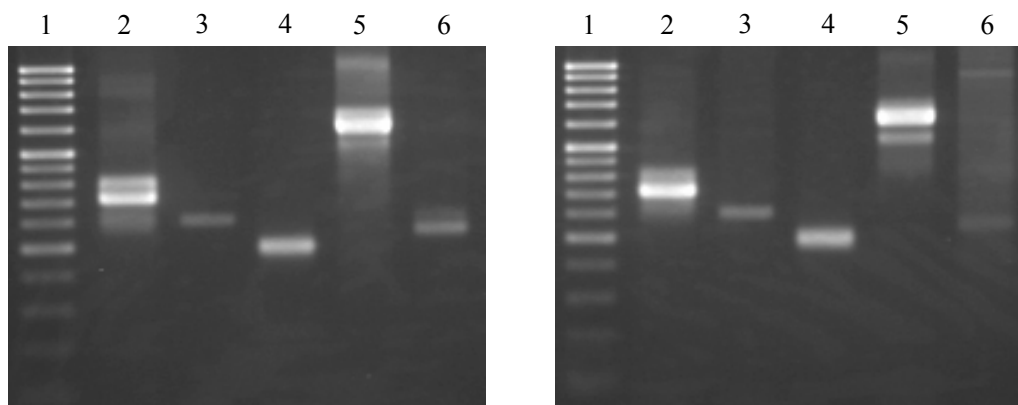
本キットを用いて抽出した土壌 DNA と高純度に精製された Lambda DNA ( Code No.318-00414 ) の吸収スペクトルを比較した。



その結果、本キットで抽出した土壌 DNA が高純度であることがわかった。

### 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。



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

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 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.

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下さい。
	DNA の沈殿が流れている。	プロトコルステップ 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 を使用して下さい。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下さい。
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 を使用して下さい。
Lysis Solution BB、Lysis Solution 20 S および 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。	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使用して下さい。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。	新しいキットを購入して下さい。 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。
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。	新しいキットを購入して下さい。 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 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 を購入して下さい。 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土壌 DNA の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下さい。

## VIII 関連製品

コード No.	製品名	包装単位	希望納入価格
316-06211	ISOIL	50 回用	28,000 円
319-06201	ISOIL for Beads Beating	50 回用	35,000 円
312-01791	Ethachinmate	0.2 ml	15,000 円
310-05251	OneSTEP Marker 1 ( / <i>Hind</i> digest )	1,500 $\mu$ l	9,000 円
313-05241	OneSTEP Ladder 100 ( 0.1-2.0 kbp )	500 $\mu$ l	16,000 円
319-05243	OneSTEP Ladder 100 ( 0.1-2.0 kbp )	500 $\mu$ l $\times$ 2	30,000 円
312-01193	Agarose S	100 g	12,000 円
318-03231	Gene <i>Taq</i> NT	250 units	22,500 円
314-03233	Gene <i>Taq</i> NT	250 units $\times$ 4	79,000 円
314-80251	HOTGoldstar <sup>TM</sup> DNA Polymerase	500 units	45,000 円

(メ モ 覧)

## 株式会社ニッポンジーン

学術営業部 学術営業課

〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7

TEL (076)451-6548

FAX (076)451-6547

Email [info@nippongene.com](mailto:info@nippongene.com)

URL <http://www.nippongene.com>