

土壤 DNA 抽出キット

ISOIL for Beads Beating

マニュアル（第 2 版）

Code No.319-06201

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
	<最大収量を得るためのプロトコル>	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 の吸収スペクトル	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. Beads Beating 後の 65°Cでのインキュベーション時間と土壌 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 for Beads Beating 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 for Beads Beating は DNA の抽出方法として界面活性剤による化学的な溶菌と Beads Beating による物理的な菌体破碎の併用を採用しています。これによって、強固な細胞壁を持つ微生物からも DNA を抽出することができ、実際の土壌微生物群集構造を反映した土壌 DNA を得ることができます。したがって、抽出した土壌 DNA は PCR-DGGE 解析等を用いた土壌微生物の群集構造解析や土壌診断、土壌 DNA の定量による土壌バイオマスの推定等に適しています。

ただし、ISOIL for Beads Beating で抽出した DNA は Beads Beating によって物理的せん断を受けている可能性がありますので、あらかじめご了承ください。

土壌 DNA を遺伝子資源として利用したい場合等、高分子土壌 DNA の抽出が必要な場合には ISOIL をご使用ください。

II キット内容

Beads Tubes	50 本
Lysis Solution BB	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ぬ。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 for Beads Beating 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。
- ・ ISOIL for Beads Beating 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>

- ・ ビーズ式破碎装置（2 ml チューブ対応のもの）
- ・ 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
- ・ 2 ml 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 Beads Tube に入れる。
- ② 950 μ l の Lysis Solution BB と 50 μ l の Lysis Solution 20S を添加する (注1)。
- ③ Beads Beat (4~6 m / 秒間または 4,200~6,800 rpm で 30~45 秒間) する (注2)。
- ④ 遠心 (12,000 \times g, 1 分間, 室温) する。
- ⑤ 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。
- ⑥ 600 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。
- ⑦ 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 $^{\circ}$ C) する (注3)。
- ⑧ 上清を捨て、Wash Solution を 1ml 加えて数回転倒混和し、遠心 (20,000 \times g, 10 分間, 4 $^{\circ}$ C) する (注4)。
- ⑨ 上清を捨て、1 ml 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 $^{\circ}$ C) する (注3)、(注5)。
- ⑩ 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) アロフェン質を非常に多く含む土壌から DNA を抽出する場合は、Lysis Solution BB の代わりに Lysis Solution BB SP1 (別売り : Code No. 313-06221) を用いて抽出操作を行ってください。Lysis Solution BB SP1 はアロフェン質を非常に多く含む土壌からの DNA 抽出用に開発された ISOIL for Beads Beating 専用のオプション溶液です。

(注2) Beads Tube の蓋がしっかり閉まっていることを確認してください。蓋のゆるみは Beads Beating 中の液漏れの原因となります。

(注3) 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4) 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、⑧の操作を省略しても構いません。

(注5) 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、Ethachinmate を添加しない場合は、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。

<最大収量を得るためのプロトコル>

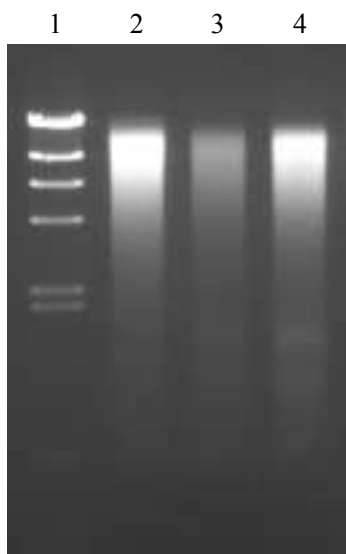
このプロトコルは、ISOIL for Beads Beating で最大収量を得るためのプロトコルです。土壌 DNA の定量による土壌バイオマスの推定等、土壌 DNA の抽出収量が重要な場合に行ってください。

- ① 0.5 g の土壌サンプルを Beads Tube に入れる。
- ② あらかじめ 65°C に加温した 950 μ l の Lysis Solution BB と 50 μ l の Lysis Solution 20S を添加する。
- ③ Beads Beat (4~6 m / 秒間または 4,200~6,800 rpm で 30~45 秒間) した後、65°C で 30 分~1 時間インキュベートする。
- ④ 遠心 (12,000 \times g, 1 分間, 室温) する。
- ⑤ 以下は標準プロトコル⑤~⑩に同じ。

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。



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

Lane 2. 東大弥生圃場対照区土壌

(アロフェン質黒ボク土 / 火山灰土壌)

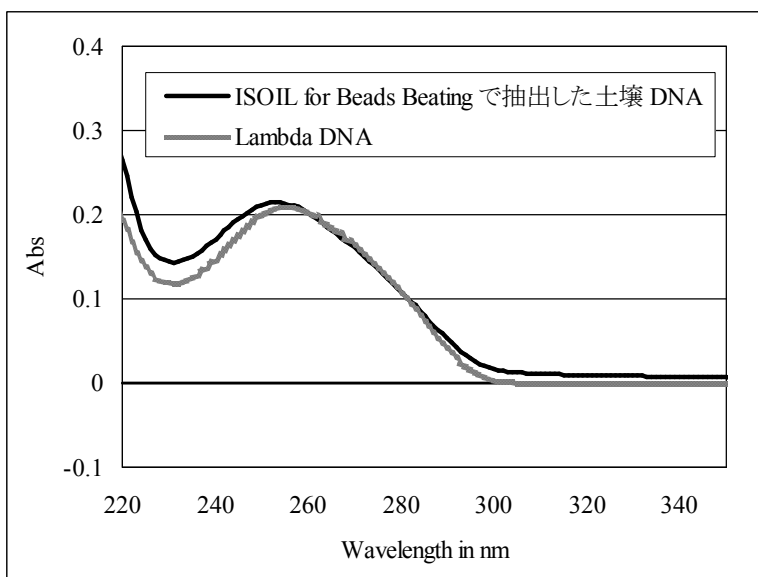
Lane 3. 埼玉農試畑土壌 (灰色低地土 / 非火山灰土壌)

Lane 4. 兵庫農試森林土壌 (褐色森林土 / 非火山灰土壌)

0.5g の土壌から抽出した DNA の 1/20 量を 1% Agarose S で電気泳動した。

2. 土壌 DNA の吸収スペクトル

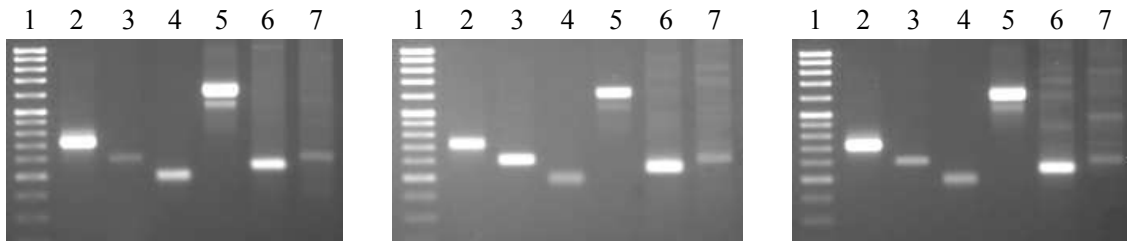
本キットを用いて抽出した東大弥生圃場対照区土壌の DNA と高純度に精製された Lambda DNA (Code No.318-00414) の吸収スペクトルを比較した。



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。



東大弥生圃場対照区土壌
アロフェン質黒ボク土

埼玉農試畑土壌
灰色低地土

兵庫農試森林土壌
褐色森林土

- 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)
- 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：

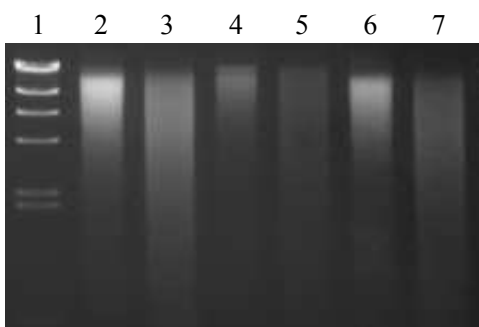
Small-Scale DNA Sample Preparation Method for Field PCR Detection of Microbial Cells and Spores in Soil.

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

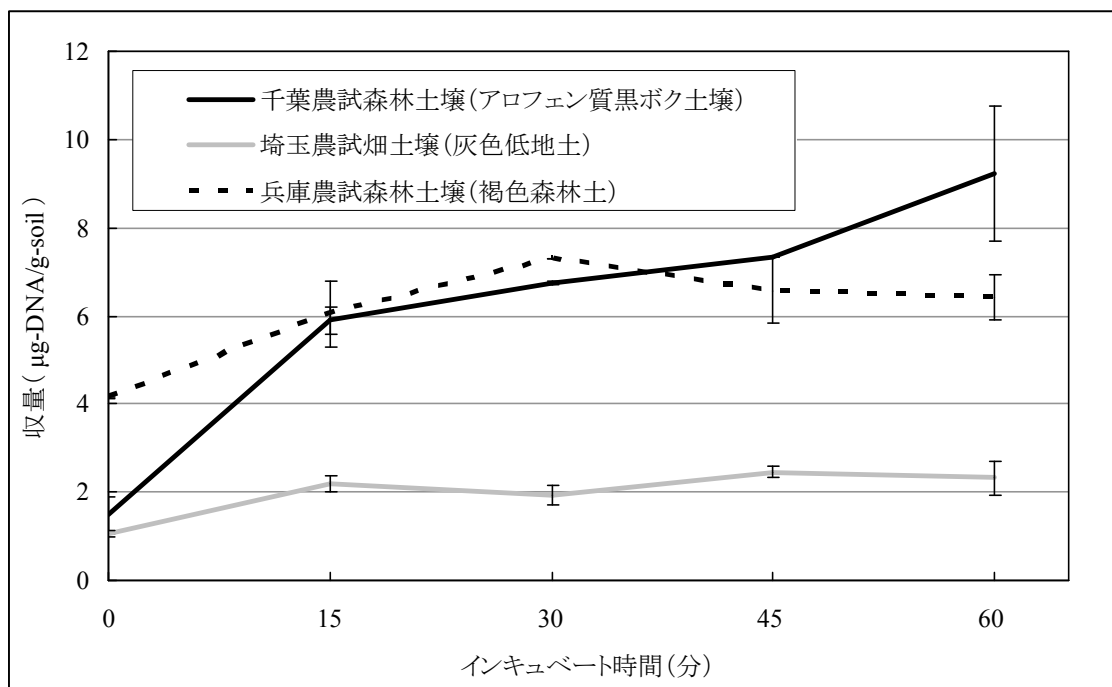
本キットで抽出した土壌 DNA を制限酵素 *EcoR* I で消化した。



- Lane 1. OneSTEP Marker 1 (λ / *Hind*III digest)
- Lane 2. 東大弥生圃場対照区土壌 DNA intact
- Lane 3. 東大弥生圃場対照区土壌 DNA / *EcoR* I
- Lane 4. 埼玉農試畑土壌 DNA intact
- Lane 5. 埼玉農試畑土壌 DNA / *EcoR* I
- Lane 6. 兵庫農試森林土壌 DNA intact
- Lane 7. 兵庫農試森林土壌 DNA / *EcoR* I

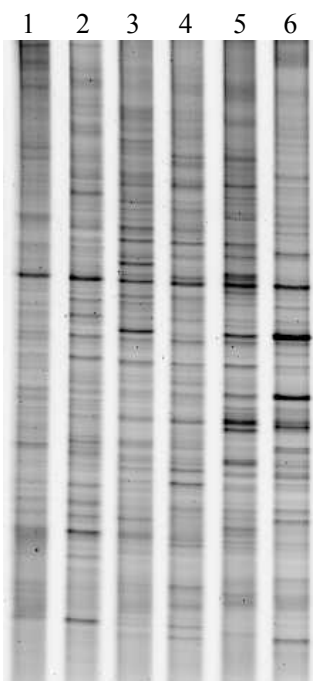
5. Beads Beating 後の 65°Cでのインキュベート時間と土壤 DNA の収量

Beads Beating 後の 65°Cでのインキュベート時間と土壤 DNA の収量について検討した結果、65°Cでインキュベートすることによって土壤 DNA の収量が増す場合があることがわかった。



6. 土壤 DNA の PCR-DGGE 解析

本キットで抽出した土壤 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壤
- Lane 2. 東大田無農場牧草地土壤
- Lane 3. 千葉農試森林土壤
- Lane 4. 草地試験場永年採草地土壤
- Lane 5. 埼玉農試畑土壤
- Lane 6. 兵庫農試森林土壤

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、Beads Beating 後に 65°C で 30 分～1 時間インキュベートすることで 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。
	土壌中のアロフェン質が非常に多い。	Lysis Solution BB の代わりに Lysis Solution BB SP1 (別売り : Code No. 313-06221) を用いて抽出操作を行ってください。Lysis Solution BB SP1 はアロフェン質を非常に多く含む土壌からの DNA 抽出用に開発された ISOIL for Beads Beating 専用のオプション溶液です。
土壌 DNA の分子量が小さい。	Beads Beating 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 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注意し、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。
Beads Tube から Lysis Solution が溢れる。	土壌の空隙体積が大きい。	土壌サンプルの使用量を 0.5g より減らしてください。

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	希望納入価格
316-06211	ISOIL	50 回用	28,000 円
313-06221	Lysis Solution BB SP1	50ml	3,200 円
312-06791	ISOIL Large for Beads ver.2	8 回用	24,000 円
318-06271	ISOFECAL	50 回用	25,000 円
315-06281	ISOFECAL for Beads Beating	50 回用	32,000 円
312-01791	Ethachinmate	0.2ml	15,000 円
310-05251	OneSTEP Marker 1 (λ / <i>Hind</i> III digest)	1,500 μ l	9,000 円
313-05241	OneSTEP Ladder 100 (0.1-2.0 kbp)	500 μ l	16,000 円
319-05243	OneSTEP Ladder 100 (0.1-2.0 kbp)	500 μ l \times 2	30,000 円
312-01193	Agarose S	100g	13,200 円
318-03231	Gene <i>Taq</i> NT	250units	22,500 円
314-03233	Gene <i>Taq</i> NT	250units \times 4	79,000 円
314-80251	HOTGoldstar TM DNA Polymerase	500units	45,000 円

株式会社ニッポンジーン

研究試薬部 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

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