

土壌 DNA 抽出キット

ISOSPIN Soil DNA

マニュアル（第 3 版）

Code No. 310-09151

NIPPON GENE CO., LTD.

I 製品説明

「ISOSPIN Soil DNA」(アイソスピソイル DNA) は、スピнкаラムを用いて土壤サンプルから DNA を抽出・精製するためのキットです。スピнкаラムによる DNA 精製方法を採用しており、フェノールやクロロホルム等の毒性有機溶媒を使用しないで、簡単に土壤サンプルから高純度な DNA 溶液を得ることができます。

非火山灰土壤はもちろん、これまで困難とされてきた火山灰土壤(黒ボク土)からも DNA の抽出が可能です。

ISOSPIN Soil DNA 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、実際の土壤微生物叢を反映した土壤 DNA を得ることができます。したがって、抽出した土壤 DNA は NGS を用いた土壤細菌叢解析等に適しています。

II キット内容

ISOSPIN Soil DNA (Code No. 310-09151)

キット構成	容量 (50 回用)	備考
Lysis Solution BB	30 ml × 1 本	
Lysis Solution 20S	5 ml × 1 本	※
Lysis Solution A	5 ml × 1 本	
SE Buffer	3 ml × 1 本	
SB Buffer	62 ml × 1 本	
SW Buffer	36 ml × 1 本	エタノール含有
TE (pH8.0)	5 ml × 1 本	
RNase A (100 mg/ml)	0.5 ml × 1 本	長期保存の場合、冷蔵/冷凍
Beads Tube	50 本 × 1 袋	
Spin Column	50 本 × 1 袋	上部パーツ: カラム 下部パーツ: Collection Tube

※ Lysis Solution 20S 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

室温保存

- ・ RNase A は室温保存可能ですが、長期間使用しない場合は冷蔵保存（4℃）もしくは冷凍保存（-20℃）してください。

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いしないで下さい。
- ・ 本品の取扱いは、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。
- ・ 製品安全データシート（SDS）は、ニッポンジーン Web サイト（www.nippongene.com）よりご覧になれます。

V プロトコール

<キット以外に必要なもの>

- 機器： ・ ビーズ式破碎装置（2 ml チューブ対応のもの）
・ 遠心分離機
・ ボルテックスミキサー
- 器具： ・ マイクロピペット
・ ピペットチップ
・ 1.5 ml マイクロチューブ
- 試薬： ・ エタノール（96～100%）

<標準プロトコール>

ビーズ式破碎装置 (2 ml チューブ対応のもの) が必要です。

- ① 0.5 g の土壌サンプルを秤量し、Beads Tube に入れる。
注) できるだけ新鮮な土壌を用いて下さい。
 - ② ← 600 μ l の Lysis Solution BB、
← 100 μ l の Lysis Solution 20S、
← 100 μ l の Lysis Solution A、
← 10 μ l の RNase A を添加する。
 - ③ **Beads Beat** (4~6 m/s で 45 秒間×2 回または 4,200~6,800 rpm で 3 分間)
注) 蓋のゆるみは Beads Beating 中の液漏れの原因となるため、Beads Tube の蓋がしっかり閉まっていることを確認して下さい。
 - ④ ← 遠心 (12,000×g, 15 分間, 室温) し、上清を回収する。
 - ⑤ 上清 400 μ l を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
注) 水分含量が少ない土壌サンプルでは、400 μ l の上清を回収できない場合があります。その場合は、次に添加する試薬 (SE Buffer) の液量比を維持してスケールダウンしてください。(例えば、上清が 360 μ l の場合、SE Buffer は 45 μ l 添加します。)
 - ⑥ ← 50 μ l (または上清に対して 0.125 倍量) の SE Buffer を添加し、
ボルテックスミキサーで十分に混合する。
 - ⑦ ← 遠心 (20,000×g, 5 分間, 室温) し、上清を回収する。
注) 沈殿物が見えない場合は、全量を回収します。
 - ⑧ 上清 400 μ l を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
注) 400 μ l の上清を回収できない場合 (または 400 μ l より多く回収できた場合) は、次に添加する試薬 (SB Buffer とエタノール) の液量比を維持してスケールダウン (またはスケールアップ) して下さい。
 - ⑨ ← 30 μ l (または上清に対して 0.075 倍量) の SB Buffer、
← 350 μ l (または上清に対して 0.875 倍量) のエタノールを添加し、
ボルテックスミキサーで十分に混合する。
- 混合液を軽くスピンドウン
(次のページ、標準プロトコールの⑩に続く)

混合液（標準プロトコール⑨からの続き）

注) 混合液の液量比は、Spin Column への DNA 吸着に影響します。混合液の液量比を守り、よく攪拌してから Spin Column へ添加して下さい。

⑩ 混合液を全量 Spin Column に添加する。

注) 混合液に析出物が生じた場合は、析出物もカラムに添加します。

⑪ 遠心（13,000×g, 30 秒間, 室温）する。
ろ液を捨てる。

注) Spin Column のカラムを外し、Collection Tube 中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。（以降、「ろ液を捨てる」は同様）

⑫ ← 600 μl の SB Buffer（1 回目）を Spin Column に添加し、
遠心（13,000×g, 1 分間, 室温）する。

⑬ ろ液を捨てる。

⑭ ← 600 μl の SB Buffer（2 回目）を Spin Column に添加し、
遠心（13,000×g, 1 分間, 室温）し、ろ液を捨てる。

⑮ ← 600 μl の SW Buffer を Spin Column に添加し、
遠心（13,000×g, 1 分間, 室温）する。

⑯ ろ液と Collection Tube を捨てる。

注) SW Buffer で洗浄した後、カラムにろ液が付着しないよう慎重に Collection Tube を取り外して下さい。カラムにろ液が付着した場合は、Spin Column を空回してから、次のステップで新しいチューブを装着して下さい。

⑰ カラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す。



⑱ ← 100 μl の TE (pH8.0) をメンブレン中央に滴下した後、
3 分間室温で静置する。

⑲ 遠心（13,000×g, 1 分間, 室温）する。

⑳ DNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される。

<オプション SP1> (火山灰土壌の場合)

火山灰土壌から DNA を抽出する場合はステップ②で添加する Lysis Solution BB の代わりに Lysis Solution BB SP1 (別売り : Code No. 313-06221) を使用することで DNA 収量を向上させることができます。

Lysis Solution BB SP1 は、黒ボク土などの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オプション溶液です。Lysis Solution BB SP1 に変える以外は、標準プロトコールと同様に操作して下さい。

① 0.5 g の土壌サンプルを秤量し、Beads Tube に入れる。

注) できるだけ新鮮な土壌を用いて下さい。

② ← 600 μ l の Lysis Solution BB SP1 (別売り : Code No. 313-06221)、

← 100 μ l の Lysis Solution 20S、

← 100 μ l の Lysis Solution A、

← 10 μ l の RNase A を添加する。

③ **Beads Beat** (4~6 m/s で 45 秒間 \times 2 回または 4,200~6,800 rpm で 3 分間)

注) 蓋のゆるみは Beads Beating 中の液漏れの原因となるため、Beads Tube の蓋がしっかり閉まっていることを確認して下さい。

④  遠心 (12,000 \times g, 15 分間, 室温) し、上清を回収する。

上清 400 μ l を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。

ステップ⑤以降は、<標準プロトコール>と同じ

<NGS 用プロトコール>

NGS (Next Generation Sequencing) による菌叢解析を行う場合は、ステップ②で添加する Lysis Solution 20S の添加量を 10 μ l にして下さい。

Lysis Solution 20S の添加量を変える以外は、標準プロトコールと同様に操作します。

① 0.5 g の土壌サンプルを秤量し、Beads Tube に入れる。

注) できるだけ新鮮な土壌を用いて下さい。

② ← 600 μ l の Lysis Solution BB、
← 10 μ l の Lysis Solution 20S、
← 100 μ l の Lysis Solution A、
← 10 μ l の RNase A を添加する。

③ **Beads Beat** (4~6 m/s で 45 秒間 \times 2 回または 4,200~6,800 rpm で 3 分間)

注) 蓋のゆるみは Beads Beating 中の液漏れの原因となるため、Beads Tube の蓋がしっかり閉まっていることを確認して下さい。

④  遠心 (12,000 \times g, 15 分間, 室温) し、上清を回収する。

上清 400 μ l を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。

ステップ⑤以降は、<標準プロトコール>と同じ

<液体サンプルからの DNA 抽出用プロトコール>

ビーズ式破碎装置 (2 ml チューブ対応のもの) が必要です。

- ① 500 μ l の液体サンプルを Beads Tube に入れる。
注) できるだけ新鮮なサンプルを用いて下さい。
 - ② ← 300 μ l の Lysis Solution BB、
← 100 μ l (NGS による菌叢解析を行う場合は 10 μ l) の Lysis Solution 20S、
← 50 μ l の Lysis Solution A、
← 10 μ l の RNase A を添加する。
 - ③ **Beads Beat** (4~6 m/s で 45 秒間×2 回または 4,200~6,800 rpm で 3 分間)
注) 蓋のゆるみは Beads Beating 中の液漏れの原因となるため、Beads Tube の蓋がしっかり閉まっていることを確認して下さい。
 - ④  スピンドアウンした後、
← 50 μ l の SE Buffer を添加し、
ボルテックスミキサーで十分に混合する。
 - ⑤  遠心 (12,000×g, 15 分間, 室温) し、上清を回収する。
注) Beads Tube 内に添加した液体量に対して、半量ほどが上清として回収できます。
 - ⑥ 上清 500 μ l を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
注) 500 μ l の上清を回収できない場合 (または 500 μ l より多く回収できた場合) は、次に添加する試薬 (SB Buffer とエタノール) の液量比を維持してスケールダウン (またはスケールアップ) して下さい。
 - ⑦ ← 40 μ l (または上清に対して 0.08 倍量) の SB Buffer、
← 450 μ l (または上清に対して 0.9 倍量) のエタノールを添加し、
ボルテックスミキサーで十分に混合する。
- 混合液を軽くスピンドアウン
(次のページ、液体サンプルからの DNA 抽出用プロトコールの⑧に続く)

混合液（液体サンプルからの DNA 抽出用プロトコール⑦からの続き）

注) 混合液の液量比は、Spin Column への DNA 吸着に影響します。混合液の液量比を守り、よく攪拌してから Spin Column へ添加して下さい。

⑧ 混合液を全量 Spin Column に添加する。

注) 混合液に析出物が生じた場合は、析出物もカラムに添加します。

⑨ 遠心（13,000×g, 30 秒間, 室温）する。
ろ液を捨てる。

注) Spin Column のカラムを外し、Collection Tube の中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。（以降、「ろ液を捨てる」は同様）

⑩ ← 600 μl の SB Buffer（1 回目）を Spin Column に添加し、
遠心（13,000×g, 1 分間, 室温）する。

⑪ ろ液を捨てる。（メンブレンに着色が見られる場合は、
← 600 μl の SB Buffer（2 回目）を Spin Column に添加し、
遠心（13,000×g, 1 分間, 室温）し、ろ液を捨てる。）

⑫ ← 600 μl の SW Buffer を Spin Column に添加し、
遠心（13,000×g, 1 分間, 室温）する。

⑬ ろ液と Collection Tube を捨てる。

注) SW Buffer で洗浄した後、カラムにろ液が付着しないよう慎重に Collection Tube を取り外して下さい。カラムにろ液が付着した場合は、Spin Column を空回してから、次のステップで新しいチューブを装着して下さい。

⑭ カラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す。



⑮ ← 100 μl の TE (pH8.0) をメンブレン中央に滴下した後、
3 分間室温で静置する。

⑯ 遠心（13,000×g, 1 分間, 室温）する。

⑰ DNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される。

VI トラブルシューティング

トラブル	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。
	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下さい。(オプション SP1 参照)
	Spin Column への吸着が不十分。	Spin Column に添加する混合液は、プロトコールに記載の通り、上清、SB Buffer、エタノールの液量比を守り、よく攪拌して下さい。
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。	Beads Beating によるせん断を避けたい場合には、界面活性剤下での加熱抽出法を採用している ISOIL (Code No. 316-06211) を使用して下さい。
	NGS プロトコールの実施 (Lysis Solution 20S の添加量が 10 µl)。	ビーズ破碎しているのである程度のせん断は避けられません。より高分子の DNA を抽出したい場合には、Lysis Solution 20S を 100 µl 添加して下さい。
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。	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下さい。品質、性能には問題ありません。
得られた DNA 溶液を用いた実験がうまくいかない。	溶出した DNA 溶液中に SW Buffer (エタノール含有) が残留している。	SW Buffer で洗浄した後、カラムにろ液が付着しないよう慎重にコレクションチューブを取り外して下さい。 カラムにろ液が付着した場合は、Spin Column を空回してから、次のステップで新しいチューブを装着して下さい。
	土壌サンプル由来の酵素反応阻害物質が残留している。	得られた DNA 溶液を希釈して使用して下さい。

VII データ

標準プロトコールと NGS 用プロトコールで、非火山灰土壌と黒ボク土（火山灰土壌）から DNA を抽出し、以下のアプリケーションに使用しました。

1. 土壌サンプルからの DNA 抽出（電気泳動結果と吸光度データ）
2. 土壌 DNA の PCR 検出
3. 土壌サンプルからの DNA 抽出、NGS を用いた土壌細菌叢解析



液体サンプルからの DNA 抽出プロトコールで、菌体カクテルから DNA を抽出し、以下のアプリケーションに使用しました。

4. 液体サンプルからの DNA 抽出、NGS を用いた土壌細菌叢解析



実験結果について、詳細はニッポンジーンの WEB サイトをご参照ください。

<https://www.nippongene.com/siyaku/product/extraction/isospin-soil-dna/isospin-soil-dna.html>

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。

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。

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
研究試薬お問い合わせ窓口

TEL 076 - 451 - 6548

URL <https://www.nippongene.com/siyaku/>

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。

ISOSPIN Soil DNA マニュアル（第3版）202504CNI