



# DNA すいすい-E

DS-0008

～DNA 簡易抽出バッファー～

土壌・汚泥向け

取扱説明書

Ver. 1.0

RIZO Inc.

## 目次

	ページ
本製品の特長	3
内容物	3
保存条件	3
使用上の注意	3
その他必要な機器・試薬	4
試料からの DNA 抽出プロトコール	5-7
トラブルシューティング	8
本製品を用いた抽出例	9
お問い合わせ先	裏表紙

### **本製品の特長**

本製品「DNA すいすい-E」は、さまざまな土壌、活性汚泥などの「環境材料」からの DNA 抽出に最適な抽出バッファーです。

精製カラムを使用せず、操作ステップ数が少ないため、スピーディーで低コストの DNA 抽出が可能です。

抽出した DNA はそのまま PCR 解析に使用できます\*。

### **内容物**

DNA すいすい-E 90 mL (約 100 回分)

### **保存条件**

高温・多湿を避け、暗所で室温保存 (20~25℃) して下さい。冬季になりますと気温低下により、本品中に白い析出物・白濁を生じることがございます。

このような場合は本品を 28℃~30℃でインキュベートし、析出物等が完全に溶解したことをご確認の上、ご利用下さい。

使用期限は上記の保存条件で開封後 6 ヶ月です。

### **使用上の注意**

本試薬は研究目的以外にご使用にならないでください。また、DNA 操作及び試薬に関する基本的知識のある方以外は取り扱わないでください

\*記載内容や製品仕様、および価格に関しては予告なしに変更する場合がございます。

## その他必要な試薬・機器

### **試薬**

イソプロパノール

70% エタノール\*

フェノール：クロロホルム（1：1、v/v）\*\*

滅菌蒸留水または TE バッファー

\* エタノール（分子生物学用）：滅菌蒸留水を 7：3 の容積比で混合したものをご利用ください。

\*\* 結晶フェノールをトリスバッファー（pH8.0）で飽和させたトリス飽和フェノールに対しクロロホルムを 1：1 の容積比で混合したものをご利用ください。又は、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1、SIGMA 社製 Cat No. P2069 など）でも代用可能です。

### **機器**

微量高速遠心機

### **その他**

1.5 ml チューブ

マイクロピペット

ピペットチップ

## 分析試料からのDNA抽出プロトコール

1. DNA すいすい-E 900  $\mu$ l (試料が活性汚泥など液体の場合には 500  $\mu$ l) をマイクロチューブに入れます。
2. 体積にして約 100  $\mu$ l (または 50~100mg) の土壌 (試料が汚泥など液体の場合には 500  $\mu$ l) を 1 に加え、蓋をして激しく上下に振り、攪拌混合します。
3. さらに、ペッスルや先を焼いて丸めたマイクロチップなどで試料を繰り返し突き、よく混合します。液体試料の場合にはピペティングで混合します。このとき、温度が室温以上に上がらないように注意してください。<sup>注①</sup>
4. 15000rpm、10 分間遠心分離を行います。上清 700  $\mu$ l を新しいマイクロチューブに移します。<sup>注②</sup>
5. フェノール：クロロホルム (1 : 1、v/v) を 300  $\mu$ l 加え、転倒混和します。
6. 15,000 rpm、10 分間遠心分離を行います。
7. 上清 500  $\mu$ l を新しい 1.5ml チューブに移し、等量のイソプロパノールを加えてよく混和します。
8. -20°C で 20 分間冷却します。
9. 15,000 rpm、10 分間遠心分離を行います。
10. 上清を捨て<sup>注③</sup>、70% エタノールを 400  $\mu$ l 入れ、沈澱の洗浄を行います。
11. 15,000 rpm、10 分間遠心分離を行います。
12. 上清を捨て、沈澱を乾燥 (風乾)<sup>注④</sup> します。

13. 30  $\mu$ l の滅菌水（または TE バッファー）に溶解し<sup>注⑤</sup>、DNA 試料とします。

\*注①～⑤については下記の「注解および留意点」をご参照ください。

#### 注解

注①ビーズ式粉碎機などを利用するとより抽出効率が上がります。過度な物理的破碎は DNA の低分子化の原因となりますのでご注意ください。

注②試料が腐葉土などの場合、上清に浮遊物が含まれることがありますが、次のステップで除去されるので問題ありません。

注③沈澱が流出しないようご注意ください。

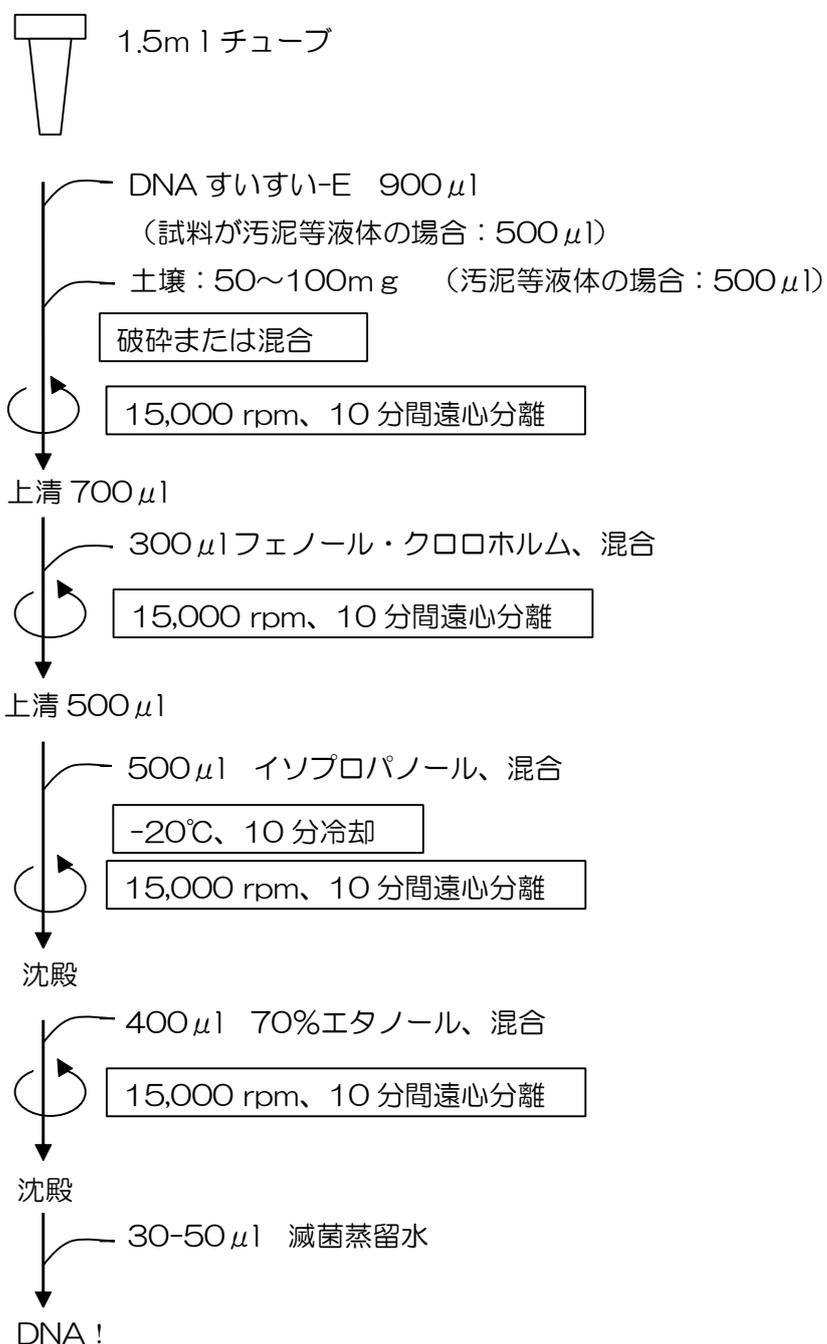
注④乾燥させすぎると水への溶解が困難になります。

注⑤試料の種類や状態、また使用目的により最適量が異なりますので、適宜調整して下さい。

#### 留意点

本プロトコールは微量サンプルからの DNA 簡易抽出用に考案されていますが、多量のサンプル向けにスケールアップすることも可能です。

## DNA 抽出プロトコール フローチャート



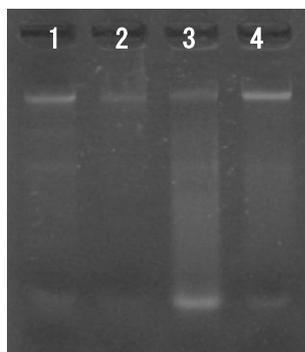
## トラブルシューティング

問題	考えられる原因	対策
DNA の収量が低い。	試料に含まれる生物細胞が少ない	できるだけ新鮮な土壌を使用するとともに、試料の量を増やし、スケールアップして抽出してください。（試料に含まれるDNA が非常に少ない場合には抽出が困難になる場合があります。）
	DNA の沈殿を捨ててしまっている	DNA の沈殿はチューブの底に近い壁面に付着しています。目視確認しながら注意して上清を捨ててください。
DNA の沈殿が着色する・DNA 溶液が着色する	試料に含まれる腐食酸が多い	抽出操作中を氷上で行うと腐食酸の混入をある程度抑えることができます。得られたDNA をさらに市販の「腐食酸除去キット」*で精製することも可能です。
PCR 反応がうまくいかない（電気泳動あるいは吸光度では DNA の抽出が確認できる）	DNA 中に腐食酸が残存している	DNA を 1000 倍程度まで段階希釈して PCR をおこなってください。あるいは、市販の「腐食酸除去キット」*などをご利用ください。
DNA すいすい-E に結晶の析出が見られる	低温によって試薬が析出している	室温に放置（あるいは 40°C 程度のぬるま湯で湯せん）し、結晶を完全に溶かしてからご利用ください。品質、性能には問題ありません。

\*PowerClean DNA Clean-up Kit (フナコシ) など

### 本製品を用いた土壌からのDNA抽出例

本製品を使用して人工水田土壌（火山灰を多く含む）、庭土（腐葉土を多く含む）、および2種類の活性汚泥から、プロトコルに従ってDNA抽出を行い、得られたDNA溶液の1/3量を泳動しました。



1：人工水田土壌

2：庭土

3：活性汚泥 A（たれ・からし工場廃液処理）

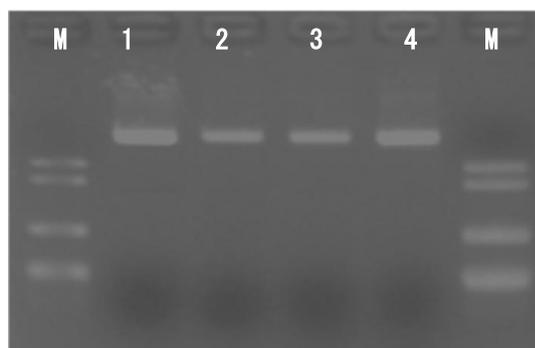
4：活性汚泥 B（給食施設廃液処理）

0.8% Agarose / 0.5×TBE

火山灰を多く含む土、腐葉土を多く含む土のどちらから、またいずれの活性汚泥からも、高分子量のゲノムDNAを抽出することが出来ました。

次に、抽出されたDNAを鋳型としてPCRを行いました。プライマーはバクテリア 16S リボゾーマル RNA 遺伝子上に設計したもの（増幅断片長 723bp）を用いました。

鋳型として抽出したDNAの250希釈液 1  $\mu$ l を使用しました。



M：サイズマーカー

（100, 200, 400, 500bp）

1：水田土壌

2：庭土

3：活性汚泥 A

4：活性汚泥 B

水田土壌、庭土、活性汚泥（2種類）とも、良好にPCR増幅を行うことが出来ました。

プライマー参考文献：Kuske et al., *Appl Environ Microbiol.* 64(7):2463-72(1998)

## **DNAすいすいーE**

### **お問い合わせ先**

株式会社リーゾ

研究部

茨城県つくば市天久保 2-9-2-B201

電話 ; 029-852-9351 FAX ; 020-4623-5611

E-mail ; info@rizo.co.jp

ホームページ ; <http://www.rizo.co.jp/>

担当 ; 門奈

Copyright ©2011 RIZO Inc. All Right Reserved.