

# 土壌からの直接 DNA 抽出方法 (ISO 11063:2020) について

○神谷貴文<sup>1,2</sup>・河合達司<sup>1</sup>・古川靖英<sup>1</sup>・中島誠<sup>1</sup>・肴倉宏史<sup>1,3</sup>・ISO/TC190 検討部会<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 土壌環境センター・<sup>2</sup> 静岡県・<sup>3</sup> 国立環境研究所

## 1. はじめに

DNA (デオキシリボ核酸) は、あらゆる生命活動を担う酵素をコードする生物の必須構成要素である。さまざまなマトリックスから DNA を抽出し、分子学的アプローチにより DNA 配列を読むことで、異なる微生物 (細菌、古細菌、真核生物) の識別が可能になる。これまで、土壌のような複雑な環境では、従来の培養ベースの微生物学的手法を適用することが困難であったが、近年、土壌から抽出した核酸の増幅に関する数多くの分子生物学的手法が開発され、微生物群集の組成、豊富さ、構造について新たな知見が得られている。DNA を用いた手法は、土壌生態学の分野で定着しており、微生物の多様性を決定するための遺伝子型 (分子遺伝学的) マーカーとして機能している。

ISO 11063:2020<sup>1)</sup>は、ISO/TC 190/SC4 Biological characterization (生物学的特性評価) によって作成され、2020 年 9 月に発行された改訂国際規格である。本規格では、リアルタイム定量 PCR (qPCR) を含む分子生物学の様々な手法を用いて微生物群集の量と組成を分析するための前段階となる、土壌サンプルから DNA を直接抽出する方法を規定している。本規格は第 2 版であり、最新の研究成果を取り入れたことで、第 1 版 (ISO 11063:2012) に規定する手法と比較して DNA の回収率が向上し、古細菌や糸状菌の群集の豊富さや構造をよりよく表されるようになった。

本稿では、本規格に紹介されている DNA 抽出方法を示す。なお、この方法は主に農業土壌や森林土壌を対象としており、有機物を多く含む土壌 (例: 泥炭土壌) または有機汚染物質及び重金属で汚染された土壌には適していない可能性があることに留意されたい。

## 2. DNA 抽出方法<sup>1)</sup>

本規格では、土壌 1 g (乾燥重量換算) から、DNA を直接抽出する手順が規定されている。まず、抽出バッファ (緩衝液) とガラスビーズを土壌サンプルに添加し、機械的及び化学的に溶解する。遠心分離の後、上清を回収し、酢酸カリウムを添加してタンパク質を沈殿させる。再び遠心分離、上清を回収し、氷冷イソプロパノールで核酸を沈殿させる。遠心分離後、回収した核酸ペレットを 70% エタノールで洗浄し、滅菌超純水または TE バッファに懸濁する。その後、アガロースゲル上での電気泳動により DNA の品質を確認し、DNA 量を蛍光光度計を用いて推定する。

### 2.1 試験材料

#### 2.1.1 土壌

土壌サンプルは採取後、ふるいにかける (2 mm メッシュ)。サンプルをすぐに処理しない場合は凍結保存しなければならない (-20°C で最大 2 年間、-80°C または液体窒素 (-180°C) で最大 10 年間)。凍結した土壌サンプルは、一度だけ解凍することができる。保存条件については現在も検討が行われている。

#### 2.1.2 化学薬品

- 1) トリス[ヒドロキシメチル]アミノメタン (トリス)、 $C_4H_{11}NO_3$  (CAS No.77-86-1)。
- 2) エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩 (EDTA)、 $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$  (CAS No.6381-92-6)。
- 3) 塩化ナトリウム、NaCl (CAS No.7647-14-5)。
- 4) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、 $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$  (CAS No.151-21-3)。
- 5) ポリビニルピロリドン (PVP)、 $[C_6H_9NO]_n$  (CAS No.9003-39-8)。
- 6) ホウ酸、 $B(OH)_3$  (CAS No.10043-35-3)。

---

Introduction to ISO 11063:2020 Soil quality - Direct extraction of soil DNA

Takafumi Kamitani<sup>1,2</sup>, Tatsushi Kawai<sup>1</sup>, Yasuhide Furukawa<sup>1</sup>, Makoto Nakashima<sup>1</sup>, Hirofumi Sakanakura<sup>1,3</sup> and Study group on ISO/TC 190<sup>1</sup> (<sup>1</sup>GEPC, <sup>2</sup>Shizuoka Prefectural Government, <sup>3</sup>NIES)

連絡先: 〒102-0083 東京都千代田区麹町 4-5 (一社) 土壌環境センター  
TEL 03-5215-5955 FAX 03-5215-5954 E-mail info@gepc.or.jp

- 7) 酢酸カリウム、 $\text{CH}_3\text{COOK}$  (CAS No.127-08-2)。
- 8) 酢酸又は氷酢酸、 $\text{CH}_3\text{COOH}$  (CAS No.64-19-7)。
- 9) イソプロパノール、 $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$  (CAS No.67-63-0)。
- 10) エタノール、 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  (CAS No.64-17-5)。
- 11) 分子生物学用水、 $\text{H}_2\text{O}$ 。

### 2.1.3 バッファ及び試薬

土壌 DNA 抽出に使用するバッファと試薬 (インターカレント分子、エタノール、イソプロパノール、SDS を除く) は、分子生物学用水で調製し、滅菌 (120°C、20 分間) した後、室温で保存する。エタノール、イソプロパノールは-20°Cで保存する。必要に応じてバッファや試薬の pH を調整する。

- 1) トリス-HCl, 1 mol/L : 121.14 g のトリスを水に溶解し、HCl (4 mol/L) で pH 8.0 に調整して 1,000 mL にメスアップする。
- 2) EDTA, 0.5 mol/L : 186.10 g の EDTA を水に溶解し、NaOH (10 mol/L) で pH 8.0 に調整して 1,000 mL にメスアップする。
- 3) NaCl, 1 mol/L : 58.44 g の NaCl を水に溶解し、1,000 mL にメスアップする。
- 4) PVP 40, 200 g/L : 200 g の PVP を水に溶解し、1,000 mL にメスアップする。
- 5) SDS, 200 g/L : 200 g の SDS を水に溶解し、1,000 mL にメスアップする。
- 6) 均質化バッファ (使用直前に新たに調製したもの) : 1 mol/L トリス-HCl (pH 8.0) 100 mL、0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 200 mL、1 mol/L NaCl 100 mL、200 g/L PVP 40 50 mL、200 g/L SDS 100 mL に 450 mL の水を加えたもの。
- 7) 酢酸カリウム, 3 mol/L (pH 5.5) : 酢酸カリウム 176.5 g を 800 mL の水に溶解し、100 mL の酢酸を加え、氷酢酸 (pH 測定推奨) で pH 5.5 に調整して 1,000 mL にメスアップする。
- 8) エタノール, 700 mL/L : 300 mL の水に 700 mL の純エタノールを加える。
- 9) TE バッファ : 1 mol/L トリス-HCl (pH 8.0) 10 mL、0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 2 mL に 988 mL の水を加えたもの (10 mmol/L トリス-HCl、1 mmol/L EDTA に調整)。
- 10) ガラスビーズ (4mm)
- 11) シリカビーズ (0.1 mm)
- 12) セラミックビーズ(1.4 mm)
- 13) 臭化エチジウム : 5 mg の臭化エチジウムを水に溶解し、1,000 mL にメスアップする。
- 14) 蛍光核酸染色剤、480 nm で励起、520 nm で発光
- 15) 子牛胸腺 DNA (100 ng/ $\mu\text{L}$ )。
- 16) TBE バッファ-10 (pH 8.0) : 108 g のトリス、55 g のホウ酸、40 mL の 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) を水に溶解し、1,000 mL にメスアップする。
- 17) TBE バッファ-1 : 100 mL の TBE バッファ-10 を 900 mL の水に溶解する。

### 2.1.4 装置

DNA を含まないプラスチックチューブ、ピペット、遠心分離機、ドラフトキャビネット、水平電気泳動システムなどの標準的な実験装置を使用する。

- 1) ホモジナイザー装置 : 速度と時間をプログラムできるもの。
- 2) 蛍光光度計 : 二本鎖 DNA の定量化 (480 nm で励起、520 nm で発光)

## 2.2 手順

### 2.2.1 土壌サンプルの準備

抽出直前に 15 mL チューブに 1 g の土壌 (乾燥重量に相当) を量り取る。すぐに処理しない場合は直ちに土壌サンプルを液体窒素で凍結し、使用するまで-80°Cで凍結保存する。

### 2.2.2 機械的・化学的溶解

- 1) 土壌サンプルにガラスビーズ (直径 4 mm) 4 個、0.1 mm シリカビーズ 2 g (保護のためマスクを着用)、セラミックビーズ (直径 1.4 mm) 2.5 g を加える。
- 2) 均質化バッファ 5 mL を加え、ホモジナイザーを用いて 4 m/s で 90 秒間攪拌する。
- 3) 70°Cで 30 分間 (できればウォーターバスで) インキュベートする。15 分、30 分の段階でボルテックスで混合する。

4) 7,000 g (20°C) で 5 分間遠心分離し、慎重に上清を回収し、新しい 5 mL チューブに移す。上清の 1 mL を回収し、タンパク質の沈殿のために 1.5 mL のチューブに入れる。残りの溶液は-20°Cで保存することで、DNA の再抽出を行うことができる。

### 2.2.3 たんぱく質の沈殿

- 1) 得られた上清 1 mL に、3 mol/L 酢酸カリウム (pH 5.5) を上清の 1/10 量になるように加える。
- 2) ボルテックスで混合し、氷上で 10 分間インキュベートする。
- 3) 14,000 g (4°C) で 5 分間遠心分離して上清を慎重に回収し、新しい 2 mL チューブに移す。

### 2.2.4 核酸の沈殿と洗浄

危険なイソプロパノールの蒸気が発生するため、これらの手順はすべてドラフト内で行うこと。液体及び固体廃棄物は、化学廃棄物として排出する必要がある。

- 1) 得られた上清に、上清の 1/1 の量の氷冷イソプロパノール (-20°C) を加え、-20°Cで 30 分間インキュベートする。
- 2) 14,000 g (4°C) で 30 分間遠心分離し、上清を慎重に除去する。
- 3) 冷たい 700 mL/L エタノールで核酸ペレットを洗浄する (ペレットを再懸濁しない)。
- 4) 14,000 g (4°C) で 5 分間遠心分離してエタノールを除去し、核酸ペレットを 37°Cで 15 分間乾燥させる。
- 5) ペレットを 200 µL の超純水または TE バッファ (pH 8) に懸濁する。

### 2.2.5 核酸の保存

土壌 DNA 懸濁液を 50 µL ずつ 4 等分し、-20°Cで保存する。抽出した DNA は凍結・融解を繰り返さない。

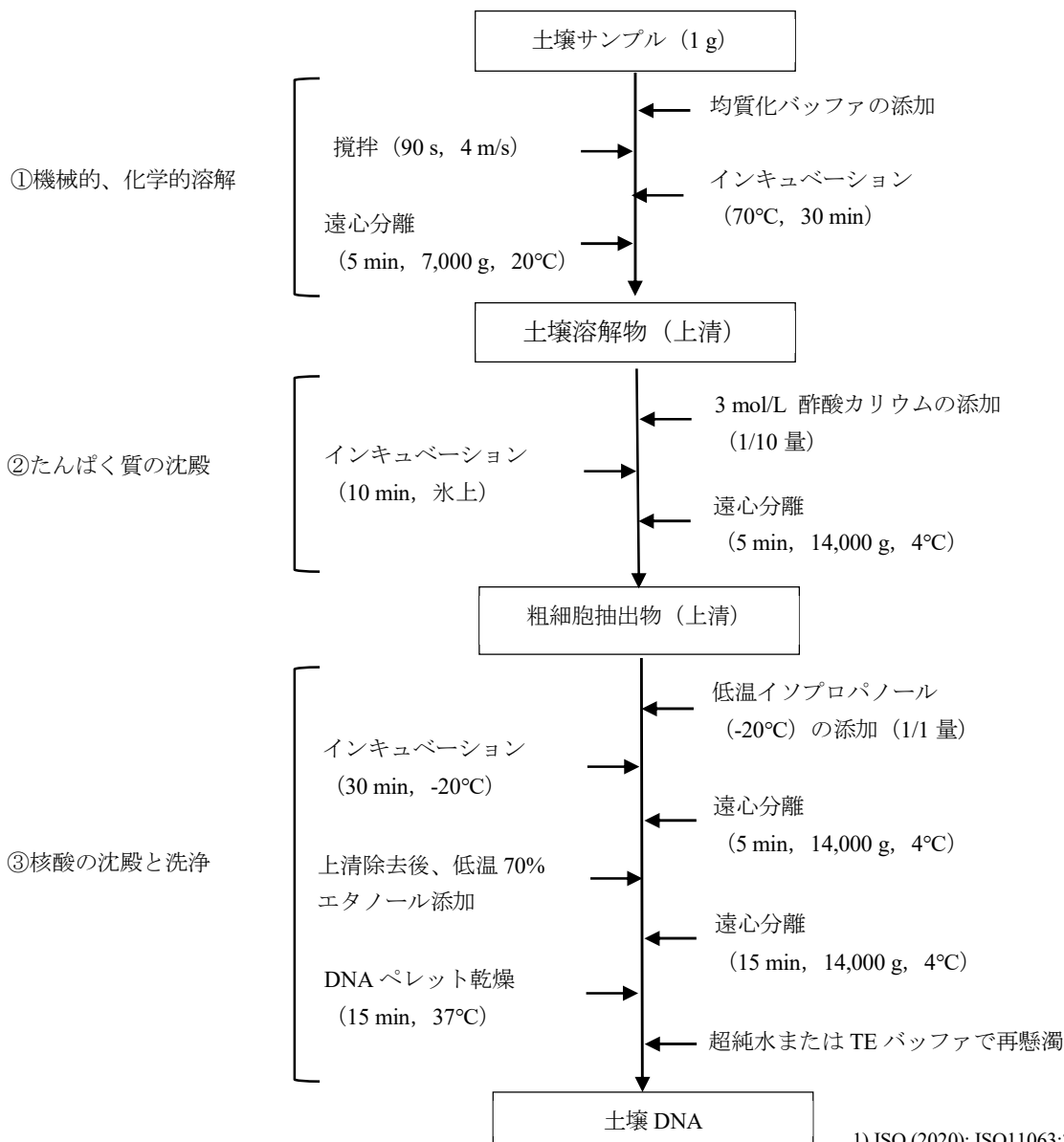


図 1 土壌 DNA 抽出手順のフロー図<sup>1)</sup>

1) ISO (2020): ISO11063:2020 Soil quality - Direct extraction of soil DNA

### 3. 土壌 DNA の質と量の推定方法<sup>1)</sup>

#### 3.1 土壌 DNA の質と純度

土壌 DNA の質とサイズは、TBE バッファ中の 1 %アガロースゲル上での電気泳動により確認する。ゲルは適切な染色を行う（例えば、臭化エチジウム 5 mg/L）。土壌 DNA の純度は、DNA 分析の場合は 260 nm、フミン酸物質の場合は 340 nm の分光光度法で評価する。

化学的・機械的な溶解のステップは重要であり、微生物を十分に溶解しつつ、DNA の断片化を避けなければならない。まだわずかに着色している DNA 抽出物には、さらに DNA 精製が必要となる（本規格では原文付属書 B に掲載）。

#### 3.2 土壌の DNA 量

土壌中の DNA 含有量は、DNA の二重らせん内に蛍光核酸染色剤を挿入し、蛍光強度を測定することで求められる。標準 DNA 量 (5,10,20,50,100,150,200 ng の子牛胸腺 DNA) と定量した蛍光量から検量線を作成し、土壌から抽出された DNA 量の推定に使用する。

または、土壌 DNA 抽出物を 1%アガロースゲル中で電気泳動により分離し、臭化エチジウムで染色してカメラで撮影することにより、子牛胸腺 DNA の希釈液による標準曲線を用いて決定できる。また、土壌 DNA がフミン酸物質 (340 nm) やタンパク質 (A260/A280 平均 1.6) で汚染されていない場合には、260 nm の分光光度法で土壌 DNA 含有量を測定することもできる。

### 4. 抽出手順の検証<sup>1)</sup>

実験室では、適切な条件下で保存されたレファレンス用土壌サンプル (ISO 18400-206<sup>2)</sup> で指定) を処理し、得られた土壌 DNA 抽出の収量を予想値と比較することにより、土壌 DNA 抽出の手順を検証する。但し書きとして、現在、異なる微生物 (異なる細菌および真菌種を含む) を人工的に混合した物を使用して、土壌 DNA 抽出の品質を検証する方法が提案、検証中であり、将来、ガイドラインに実装される可能性があることが示されている。

### 5. おわりに

土壌・地下水汚染の浄化を図る技術の一つとして、微生物等の働きを利用して汚染物質を分解するバイオレメディエーションがあり、一般的には低コストで汎用性もあることから、将来の主要浄化技術の一つにかぞえられている。微生物を利用する技術には、外部で培養した微生物を導入するバイオオーグメンテーションと、栄養物質や酸素を加えて浄化場所に生息している微生物を活性化するバイオスティミュレーションがある。特に後者の場合には土壌中の微生物群集を事前に把握しておくことが望ましく、本規格にあるような土壌 DNA の直接抽出による手法を活用する機会が増えていくと考えられる。ただし、本手法は有機汚染物質、重金属で汚染された土壌には適していない可能性があることには留意しなければならない。

実際に土壌などのマトリックスから DNA を抽出する場合、バッファや破砕用ビーズが入った市販キットが用いられることが多い。市販キットを使用する場合、その内容物や手順が本規格に示された規定に則したものかを把握しておく必要があると思われる。我が国では、黒ボク土のように DNA の吸着が著しい土壌では、スキムミルクを添加することにより、DNA の抽出が促進されることが知られている (例えば Takada-Hoshino and Matsumoto, 2004<sup>3)</sup>)。このような我が国で開発されている手法については、今後 ISO 規格に反映させていくことも必要であろう。なお、提案が採用されるには、国内外での第三者機関による検証データが必要であり、現状では、費用面で目途が立っておらず、データをどのように蓄積整備できるかが課題である。

### 参考文献

- 1) ISO (2020): ISO11063:2020 Soil quality - Direct extraction of soil DNA, 10p.
- 2) ISO (2018): ISO 18400-206:2018 Soil quality — Sampling — Part 206: Collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory, 20p.
- 3) Takada-Hoshino, Y. and Matsumoto, N. (2004): An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly adsorb DNA, *Microbes Environ*, 19, 13–19.