

S4-14 土壌からの直接DNA抽出方法(ISO 11063:2020)について

○神谷貴文^{1,2}・河合達司¹・古川靖英¹・中島誠¹・肴倉宏史^{1,3}・ISO/TC190検討部会¹
¹土壌環境センター・²静岡県・³国立環境研究所

1. はじめに

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。

- ・ISO 11063:2020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。
- ・本規格に掲載されているDNA抽出方法を示し、我が国における本規格の適用性や課題について考察する。

2. DNA抽出方法

土壌サンプルは採取後、ふるいにかける(2 mmメッシュ)。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。

機械的・化学的溶解

- 1) 土壌サンプル1 g(乾燥重量相当)にガラスビーズ(直径4 mm)4個、0.1 mmシリカビーズ2 g、セラミックビーズ(直径1.4 mm)2.5 gを添加
- 2) 均質化バッファ5 mLを加え、ホモジナイザーで攪拌
- 3) インキュベート(できればウォーターバスで)15分、30分の段階でボルテックスで混合
- 4) 遠心分離後、上清を新しい5 mL チューブに回収
上清の1 mLを1.5 mLのチューブに回収
(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可能)

たんぱく質の沈殿

- 1) 上清 1 mL に、酢酸カリウム(pH 5.5)を上清の 1/10 量になるようにを添加
- 2) ボルテックスで混合し、氷上で10分間インキュベート
- 3) 遠心分離後、上清を慎重に新しい 2 mL チューブに回収

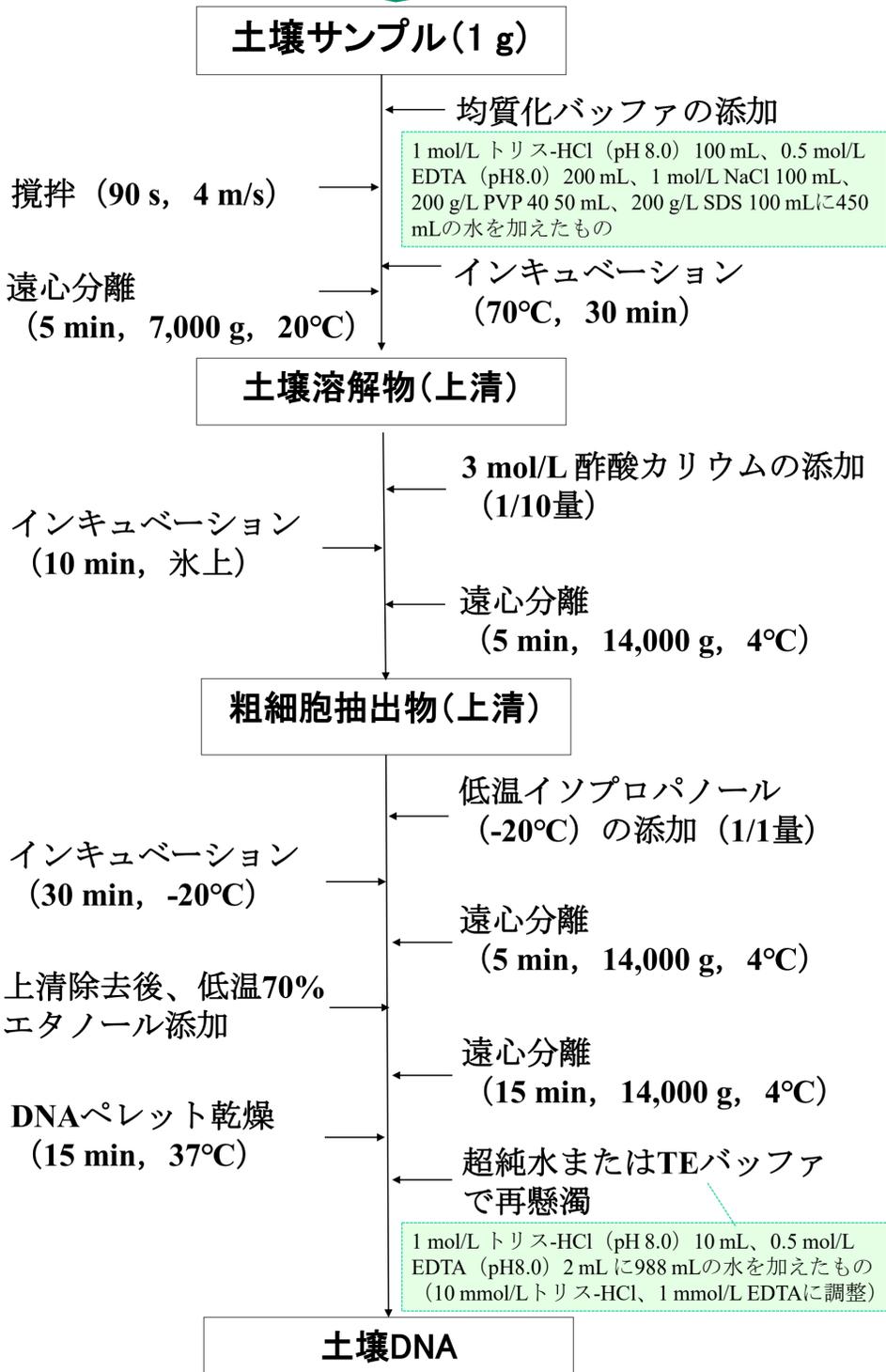
核酸の沈殿と洗浄

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

- 1) 得られた上清に、氷冷イソプロパノールを添加
-20°Cで 30分間インキュベート
- 2) 遠心分離し、上清を慎重に除去
- 3) 700 mL/Lエタノールで核酸ペレットを洗浄
- 4) 遠心分離してエタノールを除去、核酸ペレットを乾燥
- 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

核酸の保存

土壌DNA懸濁液を50 μLずつ-20°Cで保存
抽出したDNAの凍結・融解は不可



3. 土壌DNAの質と量の推定方法

質と純度

TBE バッファ (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) を10倍希釈

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(ゲルは臭化エチジウム5 mg/Lなどで染色を行う。) DNAの純度を確認するため、分光光度法で不純物のフミン酸物質(340nm)とDNA(260nm)との吸光度の比率を確認し、不純物の割合が多ければ、別途DNAの精製を行う。

DNA量

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(標準 DNA 量(子牛胸腺 DNA)と定量した蛍光量から検量線を作成) または、上記電気泳動による分離後、カメラで撮影して子牛胸腺DNAの希釈液による標準曲線を用いて評価

4. 抽出手順の検証

レファレンス用土壌サンプル(ISO 18400-206で指定)を処理、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検証(現在、異なる微生物を人工的に混合したものを使用し、土壌DNA抽出の品質を検証する方法が提案され、検証中。将来、ガイドラインに実装される可能性がある。)

5. おわりに

- ・土壌・地下水汚染の浄化を図る技術の一つであるバイオレメディエーションのうち、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では、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。
- ・実際に土壌などのマトリックスからDNAを抽出する場合、バッファや破碎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おり、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。