

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 8 月 24 日 (24.08.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/088030 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/302562
- (22) 国際出願日: 2006 年 2 月 14 日 (14.02.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2005-039554 2005 年 2 月 16 日 (16.02.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 北海道大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目 8 番地 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 信濃 卓郎 (SHI-NANO, Takuro). 佐藤 敦哉 (SATO, Atsuya). 和崎 淳 (WASAKI, Jun). 大崎 満 (OSAKI, Mitsuru).
- (74) 代理人: 特許業務法人原謙三国際特許事務所 (HARAKENZO WORLD PATENT & TRADE-MARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋 2 丁目北 2 番 6 号 大和南森町ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NUCLEIC ACID EXTRACTION METHOD, NUCLEIC ACID-EXTRACTING AGENT AND KIT FOR EXTRACTING NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称: 核酸抽出方法、核酸抽出剤、および核酸抽出用キット

(57) Abstract: It is intended to provide a method whereby a nucleic acid is extracted from a sample such as soil by economically and efficiently removing humic matters. Namely, a nucleic acid extraction method for extracting a nucleic acid from a sample which contains at least humic matters and the nucleic acid. This nucleic acid extraction method comprises the mixing step wherein a sample containing humic matters and a nucleic acid is mixed with an aqueous solution containing a magnesium salt and the removal step wherein the precipitate containing the humic matters, which has been formed in the above mixing step, is removed and the nucleic acid is extracted.

(57) 要約: 本発明は、土壌などの試料中から安価かつ効率的に腐植を除去することによって核酸を抽出する方法を提供することを目的としている。本発明の核酸抽出方法は、腐植と核酸とを少なくとも含む試料から核酸を抽出する核酸抽出方法である。この核酸抽出方法は、腐植と核酸とを少なくとも含む試料を、マグネシウム塩を含む水溶液と混合する混合工程と、上記混合工程によって生じた腐植を含む沈殿を除去して核酸を抽出する除去工程とを含んでいる。



WO 2006/088030 A1

明 細 書

核酸抽出方法、核酸抽出剤、および核酸抽出用キット

技術分野

- [0001] 本発明は、土壌などの腐植を含む試料から腐植を取り除いて、試料中に存在するDNA、RNAなどの核酸を抽出する方法、および、上記試料から核酸を抽出するために用いられる核酸抽出剤、並びに核酸抽出用キットに関するものである。

背景技術

- [0002] 土壌中には主に微生物に由来する核酸(DNA、RNA)が存在している。土壌中の微生物の動態を解析するためには、土壌から直接核酸を抽出し精製を行う必要があるものの、多くの土壌には植物の組織に由来する有機成分である腐植が存在している。この腐植は単一の化合物ではなく、種々の高分子弱酸(フミン酸、フルボ酸)を含んだ不均一な混合物である。
- [0003] この腐植は核酸と強固に結合しているため、抽出操作で完全に除去することが困難である。残存する腐植は、これらの核酸を用いたその後の解析において、酵素反応、ハイブリダイゼーション反応などに悪影響を与えるなどして、解析の妨害物質として働く。そこで、この土壌中から核酸を抽出する際には、土壌に含まれる腐植を取り除くことが多くの研究者の課題となっている。
- [0004] この腐植を除く技術としては、例えば、特許文献1、特許文献2、非特許文献1、および非特許文献2に開示されているものが挙げられる。
- [0005] 特許文献1に記載のDNA調製物の精製方法は、腐植を含むDNA調製物をジチオカルバミン酸塩と水性液相で接触させて不溶物を除去するという方法である。
- [0006] 特許文献2に記載のDNAの抽出方法は、腐植酸を含む環境中に存在する微生物由来のDNAの抽出方法である。この方法では、水溶液中で微生物を破壊する場合に、水溶性の腐植酸吸着剤を添加することを特徴としている。そして、上記水溶性の腐植酸吸着剤は、好ましくは、ポリビニルピロリドン(Polyvinyl pyrrolidone、以下「PVP P」と表記する)である。
- [0007] 非特許文献1には、CTAB(hexadodecyltrimethylammonium bromide)を主体とする

抽出バッファーを用いて、土壌からビードビーター (bead beater : Bio 101/Savant, Farmingdale, N.Y.)を用いて微生物の核酸を抽出する手法が記載されている。

[0008] 非特許文献2には、土壌からDNAおよびRNAを抽出する方法であって、抽出を行う前にRNA安定化剤としてGuanidine thiocyanateを主体とする溶液を加え、その後、凍結融解法によって菌体を破壊して、CTABとSDSとを主体とする抽出溶液で核酸を抽出するという方法が記載されている。

[0009] [特許文献1]

特開平7-241193号公報 (公開日:平成7年(1995年)9月19日)

[特許文献2]

特開2001-17168号公報 (公開日:平成13年(2001年)1月23日)

[非特許文献1]

Burgmann, et al., Apr. 2003, Appl. Env. Microbiol. 69, 1928-1935, "mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of nifH gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil"

[非特許文献2]

Hurt, et al., Oct. 2001, Appl. Env. Microbiol. 67, 4495-4503, "Simultaneous Recovery of RNA and DNA from Soils and Sediments"

以上のように、核酸を含む土壌などの試料から腐植を取り除く方法に関しては、これまでに多くの研究者によって研究されてきているが、簡便に効率よく腐植を除去する手法はいまだ開発されていないのが現状である。

[0010] 特に、本願発明者らが、上記非特許文献1および2に記載の手順に従って実験を行ったところ、手順が煩雑である上、腐植が多い土壌の場合には腐植を十分に除去することができず、核酸をうまく抽出できないという問題点が生じた。

[0011] また、これまでに提案されているその他の手法として、PVPPをゲル中に混在させてこれに吸着させて、電気泳動を行った後に核酸のバンドのみ切り出す手法、および既存の土壌核酸精製キット(例えば、Bio101 Soil RNA Extraction Kit (Q-BIOgene社製)、Bio101 Soil DNA Extraction Kit (Q-BIOgene社製)、SoilMaster DNA Extraction Kit (EPICENTRE社製)など)を用いて精製する手法などが存在する。しかし、前者

は操作が煩雑であり、精製度も低いという問題点を有しており、後者は高価であるという問題点を有している。

- [0012] 本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたものであって、その目的は、土壌などの試料中から安価かつ効率的に腐植を除去することによって核酸を抽出する方法を提供することにある。

発明の開示

- [0013] 本願発明者らは、上記の課題について鋭意検討した結果、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムなどのマグネシウム塩の水溶液を、精製対象となる核酸を含む試料に添加すると、核酸は水溶液中に溶解させた状態で、夾雑物として試料中に混入している腐植を効率的よく沈殿させることができることを見出し、本発明を完成させるに至った。
- [0014] すなわち、本発明にかかる核酸抽出方法は、腐植と核酸とを少なくとも含む試料から核酸を抽出する核酸抽出方法であって、上記試料を、マグネシウム塩を含む水溶液と混合する混合工程と、上記混合工程によって生じた腐植を含む沈殿を除去して核酸を抽出する除去工程と、を含んでなることを特徴としている。
- [0015] 上記の核酸抽出方法によれば、腐植と核酸とを含む試料を、マグネシウム塩を含む水溶液と混合することによって、抽出したい核酸については水溶液中に溶解させた状態とし、除去したい腐植については効率よく沈殿させることができる。したがって、上記の方法によれば、煩雑な操作を必要とせず、安価かつ効率的に腐植を除去して核酸を精製することができる。
- [0016] 本発明の核酸抽出方法において、上記マグネシウム塩は、塩化マグネシウム、または硫酸マグネシウムの何れかであることが好ましい。
- [0017] 上記マグネシウム塩が、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムの何れかであれば、混合工程において、除去したい腐植を効率よく沈殿させることができる。
- [0018] 本発明の核酸抽出方法において、上記水溶液におけるマグネシウム塩の濃度は、約0.5～約1.0mol/Lであることが好ましい。
- [0019] マグネシウム塩の濃度が、0.5mol/Lより低いと腐植の除去効率が低下する。一方、マグネシウム塩の濃度が、1.0mol/Lより高いと核酸の回収率が低下する。し

たがって、マグネシウム塩の濃度は、0.5～1.0mol/Lであることが好ましい。なお、「約0.5mol/L」とは、四捨五入によって0.5mol/Lとなる濃度のことを意味する。また「約1.0mol/L」についても同様に、四捨五入によって1.0mol/Lとなる濃度のことを意味する。

[0020] 本発明の核酸抽出方法は、上記混合工程の前に、上記試料にPEG/NaCl溶液を添加して試料中に含まれる核酸を沈殿させる沈殿工程をさらに含んでもよい。

[0021] 上記のように、マグネシウム塩を含む水溶液を用いて腐植を沈殿させる前段階で、試料にPEG/NaCl溶液を添加することによって、腐植は溶液中に溶解した状態で核酸を効率よく沈殿させることができる。それゆえ、上記沈殿工程によって、試料中の核酸を沈殿させ、この沈殿を取得した後、再度この核酸を含む沈殿を溶液中に溶解させ、マグネシウム塩と混合する混合工程を実施することによって、より効率的に試料中から腐植を除去することができる。

[0022] ここで、上記「PEG」とは、ポリエチレングリコールのことを意味する。また、PEG/NaClとは、より具体的には、20% (w/v) polyethylene Glycole 6000, 2.5 M NaClのことを意味する。

[0023] 本発明の核酸抽出方法は、上記沈殿工程の前に、上記試料にCTABを添加するCTAB添加工程をさらに含んでもよい。

[0024] ここで、「CTAB」とは、hexadecyltrimethylammonium bromideあるいはcetyltrimethylammonium bromideのことを意味する。CTABは、陽イオン変性剤であり、低イオン溶液中で核酸と酸性の多糖を沈殿させ、タンパク質と中性多糖を溶液中に残す。その一方で、CTABは、高イオン濃度下では、タンパク質と大部分の酸性多糖とともに複合体を形成し、核酸を溶液中に残す。このような性質を有することから、CTABは多糖類などの夾雑物を多く含む組織から核酸を抽出するために利用される。

[0025] そのため、上記のように、核酸抽出の最初の段階で、CTABを添加することによって、試料中から効率的に核酸を抽出することができるという効果が得られる。

[0026] 本発明の核酸抽出方法は、上記除去工程の後に、塩化リチウム溶液を上記試料に添加する添加工程をさらに含むことが好ましい。

[0027] 上記のように、除去工程後の核酸を含む試料に塩化リチウム溶液を添加することに

よって、上記除去工程の後にさらに核酸中に混在する腐植を上澄み液に残し、核酸のみを効率よく沈殿させることができる。そして、この沈殿を従来公知の手法を用いて採取すれば、核酸の精製度をより高めることができる。

[0028] また、本発明にかかる核酸抽出剤は、上記課題を解決するために、腐植と核酸とを少なくとも含む試料から核酸を抽出するために用いられる核酸抽出剤であって、マグネシウム塩を少なくとも含むことを特徴としている。

[0029] 本発明の核酸抽出剤を水溶液の状態にし、この水溶液を腐植と核酸とを含む試料に混合させることによって、抽出したい核酸については水溶液中に溶解させた状態とし、除去したい腐植については効率よく沈殿させることができる。そして、この沈殿を除去することによって、精製度の高い核酸を得ることができる。

[0030] また、本発明にかかる核酸抽出用キットは、上記課題を解決するために、腐植と核酸とを少なくとも含む試料から核酸を抽出するために用いられる核酸抽出用キットであって、マグネシウム塩およびCTABを少なくとも含むことを特徴としている。

[0031] 本発明にかかる核酸抽出用キットは、マグネシウム塩およびCTABを少なくとも含むものであればよい。その他の具体的な構成については特に限定されるものではなく、必要な試薬や器具等を適宜選択してキットの構成とすればよい。当該核酸抽出用キットを用いることにより、簡便かつ効率的に試料から腐植を除去して核酸を抽出することができる。

[0032] 本発明にかかる核酸抽出方法は、以上のように、試料を、マグネシウム塩を含む水溶液と混合する混合工程と、上記混合工程によって生じた腐植を含む沈殿を除去して核酸を抽出する除去工程と、を含んでなるものである。

[0033] それゆえ、本発明の核酸抽出方法によれば、腐植と核酸とを含む試料を、マグネシウム塩を含む水溶液と混合することによって、抽出したい核酸については水溶液中に溶解させた状態とし、除去したい腐植については効率よく沈殿させることができる。したがって、上記の方法によれば、煩雑な操作を必要とせず、安価かつ効率的に腐植を除去して核酸を精製することができるという効果を奏する。

[0034] 本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分わかるであろう。また、本発明の利益は、次の説明で明白になるであろう。

図面の簡単な説明

[0035] [図1]本実施例において、土壌から核酸の抽出操作を行って得られた試料について、電気泳動を行った結果を示すアガロースゲルの模式図である。

[図2]本実施例において、土壌から核酸の抽出操作を行って得られた試料についてアガロースゲル電気泳動を行った後に、当該アガロースゲルをSYBR Green Iで染色した結果を示す模式図である。

[図3]本実施例においてマグネシウム塩を試薬として核酸抽出を行った結果と、比較のために他の金属塩溶液を試薬として用いて核酸抽出を行った場合の結果とを示す表である。

[図4]本実施例において、土壌から取得されたRNAを用いて、RT-PCR-DGGEを行った結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0036] 以下、本発明についてより具体的に説明するが、本発明はこの記載に限定されるものではない。

[0037] 本発明にかかる核酸抽出方法は、腐植と核酸とを少なくとも含む土壌などの試料から核酸を抽出する核酸抽出方法であって、上記試料を、マグネシウム塩を含む水溶液に添加して混合する混合工程と、この混合工程によって生じた沈殿を除去して核酸を抽出する除去工程とを、少なくとも含んでいる。

[0038] このように、本発明では、マグネシウム塩を含む水溶液中に核酸と腐植とを含む試料を添加し、混合することによって、抽出目的となる核酸については水溶液中に溶解させた状態とし、除去したい腐植については効率よく沈殿させることができる。したがって、腐植を多量に含んでいる土壌、河川沈殿物、汚泥、胃腸内内容物、糞便などを試料として、当該試料から核酸を効率よく抽出することができる。上記試料から、腐植を除去することによって、その後に行われる核酸(DNA、RNA)の解析を円滑に行うことができる。

[0039] ここで、「腐植」とは、土壌中に存在する有機物、特に、暗褐色を呈する有機物のことを指す。英名は、“Humic substances”である。腐植を構成する物質は、腐植酸、フルボ酸、ヒューミンなどであり、これら各化合物が混合して腐植を構成している。これら

の各化合物は、土壤中に存在する生物遺体の分解物、および、土壤中に存在する微生物の再合成産物、すなわち、タンパク質、炭水化物、これらの誘導体、脂質、リグニンおよびこれらの分解生成物に由来するものである。

[0040] そして本発明の核酸抽出方法では、上記マグネシウム塩としては、塩化マグネシウム(MgCl_2)、または硫酸マグネシウム(MgSO_4)の何れかを使用することが好ましい。これによれば、後述の実施例にも示すように、土壌などの試料から腐植を効率よく除去することができる。また、上記マグネシウム塩として、塩化マグネシウム(MgCl_2)、または硫酸マグネシウム(MgSO_4)の何れかを使用すれば、特に腐植の含有割合の多い試料の場合でも、核酸の精製度を高めることができるため、その後に行われる核酸の解析に支障をきたすことがない。さらに、塩化マグネシウム(MgCl_2)、および硫酸マグネシウム(MgSO_4)は、抽出された核酸のその後の酵素反応、ハイブリダイゼーション反応などに悪影響を与えないという利点も有している。

[0041] なお、本発明では、上記マグネシウム塩として、塩化マグネシウム(MgCl_2)、硫酸マグネシウム(MgSO_4)の何れかを使用することが好ましいが、必ずしもこれに限定されることはなく、他のマグネシウム塩を用いることもできる。また、マグネシウム塩の範疇に含まれる複数の化合物を混合して用いてもよい。

[0042] また、本発明の核酸抽出方法において、マグネシウム塩の濃度は、約0.5～約1.0M(換言すれば、約0.5～約1.0mol/L)であることが好ましい。塩化マグネシウムの濃度は、0.5Mよりも低濃度であると腐植の除去効率が低下し、1.0Mよりも高濃度であると核酸の回収率が低下する。なお本明細書において「～」は「以上、以下」を意味し、例えば「★★～☆☆」は「★★以上、☆☆以下」を意味する。

[0043] また上記マグネシウム塩の添加量は、試料溶液1に対して体積比で0.1～2.0volumeであることが好ましく、1volumeであることが最も好ましい。上記好ましい範囲未満であると腐植の除去効率が低下し、上記好ましい範囲を超えると核酸の回収率が低下する。なお、以下、適宜「volume」を「vol」と表記する。

[0044] また、本発明の核酸抽出工程において、上記混合工程の前に、上記試料にPEG/NaCl溶液を添加して試料中に含まれる核酸を沈殿させる沈殿工程をさらに含んでもよい。このように、マグネシウム塩を含む水溶液を用いて腐植を沈殿させる前段

階で、試料にPEG／NaCl溶液を添加することによって、腐植は溶液中に溶解した状態で核酸を効率よく沈殿させることができる。上記PEG／NaCl溶液の添加は、上記の効果を得ることができる添加量および添加方法であれば特に限定されるものではないが、例えば、20MのPEG／NaCl溶液を添加する場合、試料溶液1に対して体積比で0.9～1.2volを添加することが好ましく、1.0625volを添加することが最も好ましい。上記好ましい範囲未満であると腐植の除去効率が低下し、上記好ましい範囲を超えると核酸の回収率が低下する。

[0045] さらに、上記沈殿工程の前に、上記試料にCTABを添加するCTAB添加工程をさらに含んでもよい。核酸抽出の最初の段階で、CTABを添加することによって、試料中に含まれる多糖類などの夾雑物の除去を促進するという効果が得られる。上記CTABの添加は、上記の効果を得ることができる添加量および添加方法であれば特に限定されるものではないが、例えば0.02% (w/v) のCTAB溶液を添加する場合、試料0.5gに対して比重を1とした場合に0.25～2.5volを添加することが好ましく、0.5から2volを添加することがさらに好ましく、1.25volを添加することが最も好ましい。上記好ましい範囲未満であると試料中に含まれる多糖類などの夾雑物の除去効率が低下し、上記好ましい範囲を超えると核酸の回収率が低下する。

[0046] また、本発明の核酸抽出方法において、上記除去工程の後に、塩化リチウム溶液を上記試料に添加する添加工程をさらに含むことが好ましい。上記のように、除去工程後の核酸を含む試料に塩化リチウム溶液を添加することによって、上記除去工程の後にさらに核酸中に混在する腐植を上澄み液に残し、核酸のみを効率よく沈殿させることができる。上記塩化リチウムの添加は、上記の効果を得ることができる添加量および添加方法であれば特に限定されるものではないが、例えば、10Mの塩化リチウムを添加する場合、試料溶液1に対して体積比で1volを添加することが最も好ましい。上記好ましい範囲未満であると試料中に含まれる多糖類などの夾雑物の除去効率が低下し、上記好ましい範囲を超えると核酸の回収率が低下する。

[0047] なお、本発明にかかる核酸抽出方法において、マグネシウム塩を含む水溶液を用いて試料中の腐植を沈殿させるという手法以外の核酸抽出の手順については、従来公知の核酸抽出の手順に準じて行うこともできる。この従来公知の方法としては、例

えば、非特許文献1、非特許文献2に記載の手順を用いることができる。また、これら2つの文献に記載の手法を組み合わせることもできる。

- [0048] 本発明にかかる核酸抽出方法では、例えば、その他の試薬としてRNase inhibitorを添加する事によって、核酸(RNA)の精製度を高めることもできる。このRNase inhibitorを添加するタイミングは、PEG/NaCl溶液を添加することによって生じた沈殿を溶解した後である。
- [0049] また、本発明の核酸抽出方法において、精製対象となる核酸(DNAあるいはRNA)は、土壌などの腐植物質中に存在する微生物のみならず、他の生物、例えば植物、動物由来のDNA、RNAであってもよい。
- [0050] また、上記試料としては、腐植と核酸とが少なくとも含まれている可能性があるものであれば特に限定されることはなく、環境中に存在する種々の液状物・固形物を試料とすることができる。上記試料としては、例えば、土壌、河川沈殿物、汚泥、胃腸内内容物、糞便などが挙げられる。
- [0051] また、本発明にかかる核酸抽出剤は、腐植と核酸とを少なくとも含む試料から核酸を抽出するために用いられる核酸抽出剤であって、マグネシウム塩を少なくとも含むものである。上記核酸抽出剤は、既述した本発明の核酸抽出法の実施に利用される。
- [0052] この核酸抽出剤は、例えば、 MgCl_2 、 MgSO_4 などのマグネシウム塩を含む水溶液であってもよい。そして、上記水溶液中におけるマグネシウム塩の濃度は、約0.5～約1.0Mであることが好ましい。
- [0053] また、本発明にかかる核酸抽出用キットは、マグネシウム塩およびCTABを少なくとも含み、核酸抽出の手順ごとに上記各試薬が計量されて小分けされるなどしてキット化されたものである。上記核酸抽出用キットに含まれるマグネシウム塩は、特に MgCl_2 溶液であることが好ましい。
- [0054] また、本発明にかかる核酸抽出用キットに含まれる具体的な試薬としては、例えば、Extraction Buffer(DTT、CTAB、NaOAc含有)、PEG/NaCl溶液、 MgCl_2 溶液、DNase溶液などが挙げられる。本発明の核酸抽出用キットを用いることにより、簡便かつ効率的に試料から腐植を除去して核酸を抽出することができる。上記核酸抽出

キットは、既述した本発明の核酸抽出法の実施に利用される。

- [0055] 本発明によれば、土壌などから微生物由来の核酸(DNA、RNAなど)を抽出し、これらを解析することができる。ここで「解析」とは、DNAの場合はPCR、PCR-DGGE、制限酵素処理、クローンライブラリーの作製などのことである。また、RNAの場合はRT-PCR、RT-PCR-DGGE、クローンライブラリーの作製、マイクロアレイを用いた試験に利用が可能である。また、腐植を核酸から除去する手法を利用して、土壌由来のDNA、RNAのFISH解析への応用も可能である。
- [0056] また、本発明の核酸抽出剤を実際に利用する場合には、後述の実施例に記載の通り、土壌からの核酸抽出方法における一連の操作の中で当該核酸抽出剤を使用することが望ましい。また上記核酸抽出剤は、核酸抽出キットを構成する1つのアイテムとして利用される。
- [0057] また、本発明の核酸抽出方法を利用した腐植の除去方法は、土壌中の様々な化合物を分析する場合にも有効であり、例えば土壌中に含まれるタンパク質(あるいはこれに準じたペプチド)の分析にも応用が可能である。
- [0058] 本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能である。すなわち、請求項に示した範囲で適宜変更した技術的手段を組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

実施例

- [0059] 以下に、本発明の実施例について説明する。

[実施例1]

実施例1では、下記の試薬を用いて、下記の手順によって土壌試料中からDNA、RNAの抽出を行った。なお、この実施例で用いた操作手順は、非特許文献1に準じたものである。

- [0061] まず、以下に示す試薬を用意した。なお、上記核酸抽出用キットあるいは上記土壌核酸精製キットには、これらの試薬が含まれていることが好ましい。

[0062] <用意する試薬>

・10%(w/v) CTAB(H_2O 17ml + 2g CTAB, mess up 20 ml、すなわち10%(w/v) CTABは、2g CTABを17ml MilliQ grade RNase Free H_2O (あるいは、DEPC処理済

みRNase Free H_2O)に溶解し20mlにメスアップして調製された。なお本実施例で使
用したCTABの製造元は、Sigma-Aldrich社である。)

• A solution: 0. 2M $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (71. 63g/L)

• B solution: 0. 2M $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (31. 21g/L)

• 1M 1,4-dithio-DL-threitol (以下「DTT」と表記する)

• 5M NaCl

• 0. 5M EDTA

• 20% (w/v) PEG / 2. 5M NaCl (20g PEG 6000 in 2.5M NaCl 100ml、すなわち2
0% PEG / 2. 5M NaClは、20gPEG 6000 を2. 5M NaCl溶液 100mlに溶解し
て調製された。以下「PEG/NaCl溶液」と表記する)

• RNase free DNaseI

• 3M NaOAc (pH 4.5) (81.62g $NaOAc \cdot 3H_2O$, 100ml H_2O , adjust pH with acetic aci
d, mess up 200ml by H_2O 、すなわち3M NaOAc (pH 4.5)は、81. 62g $NaOAc \cdot 3H_2$
Oを100mlの H_2O に溶解し、酢酸 (acetic acid) でpHを4. 5に調整し、200mlに H_2
Oでメスアップして調製された)

• Phenol (pH 4.5) (500g Phenolを H_2O 300mlに溶解して調製された)

• Phenol(pH 4.5)/TE(pH 8.0)

• Chl/iso (Chloroform: Isoamyl alcohol = 24v: 1v)

• 1. 0M $MgCl_2$

• Glycogen 10mg/ml

続いて、Extraction Buffer 1を作製した。作製方法は以下の通りである。

(1) A solution 47.35 ml

(2) B solution 2.65 ml

(3) 1M DTT 100 μ l

(4) 5M NaCl 2ml

(5) 10% (w/v) CTAB 200 μ l

上記(1)～(5)の試薬を混合し、MilliQ grade RNase Free H_2O (あるいは、DEPC処
理済みRNase Free H_2O)で100mlにメスアップした。なお、MilliQ grade RNase Free

H₂Oは、MilliQ (Water社製の純水製造装置) で作製された高精度純水のことを意味する。また、DEPC処理済みRNase Free H₂Oは、脱塩水に0.1% (v/v) になるようにDiethyl Pyrocarbonateを加え、室温で12時間以上放置し、オートクレーブ (121℃、30分以上) 処理することによって作製されたものである。

[0063] 続いて、RNA Extraction Bufferを作製した。作製方法は以下の通りである。

(i) 1M DTT 100 μ l

(ii) 10% (w/v) CTAB 600 μ l

(iii) 3M NaOAc (pH 4.5) 1667 μ l

上記(i)～(iii)の試薬を混合し、MilliQ grade RNase Free H₂O (あるいは、DEPC処理済みRNase Free H₂O) で100mlにメスアップした。

[0064] 次に、下記の(1-1)～(1-17)の手順で操作を行った。

(1-1) : Silica beads (0.1 mm 直径) 0.75gを2ml容 遠心チューブに入れる。

(1-2) : 0.5g Soilを2ml容 遠心チューブに入れる。

(1-3) : bead beater (QIAGEN MM 300) のプレートを37℃であらかじめ温めておく。

(1-4) : 1.25ml Extraction Buffer 1を(1-2)記載の2ml容 遠心チューブに加える。

(1-5) : bead beaterの設定を45sec, 25 s⁻¹とする。

(1-6) : (1-4)記載の試料をbead beaterで処理後、17,400 $\times$ g で5分間遠心分離を行う。

(1-7) : (1-6)記載の遠心分離により得られた上澄み液を750 μ l取り、別の2ml容 遠心チューブに移す。

(1-8) : (1-7)記載の遠心チューブに、656 μ l phenol/TEと656 μ l Chl/isoとを加え、よく転倒混和する。

(1-9) : (1-8)の処理後の遠心チューブを、17,400 $\times$ g 5分間で遠心分離を行う。

(1-10) : (1-9)記載の遠心分離により得られた上澄み液750 μ lを、別の2ml容 遠心チューブに移す。

(1-11): (1-10)記載の遠心チューブへ、1312 μ l Chl/isoを加え、よく転倒混和する。

(1-12): (1-11)記載の遠心チューブを、17,400 $\times$ g 3分間遠心分離を行う。

(1-13): (1-12)記載の遠心分離により得られた上澄み液 750 μ lを別の遠心チューブに移す。

(1-14): (1-13)記載の上澄み液に、PEG/NaCl溶液 797 μ lを加えてピペッティングを行って、よく混合する。

(1-15): (1-14)記載の溶液を、37°Cの恒温槽内で一時間静置する。

(1-16): (1-15)後の溶液を、17,400 $\times$ g 30分間(室温)で遠心分離を行う。

(1-17): (1-16)記載の遠心分離により得られた上澄み液を捨て、沈殿を70% (v/v) エタノール(「EtOH」と表記する)で洗浄した後、当該沈殿を乾燥させる。

[0065] 次に、下記の(2-1)～(2-8)の手順で操作を行った。

(2-1) : (1-17)で得られた沈殿をH₂O 400 μ lで完全に溶解する。

(2-2) : (2-1)記載の溶液に1.0M MgCl₂ 400 μ lを加えてよく混ぜる。

(2-3) : (2-2)記載の溶液を17,400 $\times$ g 10分間 遠心分離を行う。この時遠心分離の停止は緩やかに行う(soft brake)。

(2-4) : (2-3)記載の遠心分離後の上澄み液を別の2ml容 遠心チューブに移す。ここで、沈殿の沈降度が緩い場合は再度遠心分離を行う。

(2-5) : ここで、溶液の腐植の除去がまだ完全でない場合は、(2-5)の上澄み液に850 μ lのPEG/NaCl溶液を加えてピペッティングする。

(2-6) : (2-4)または(2-5)により得られた上澄み液を、37°Cで一時間静置する。

(2-7) : (2-6)後の上澄み液を、17,400 $\times$ g 30分間、遠心分離を行う。

(2-8) : 沈殿を70% (v/v) EtOHで洗浄した後、当該沈殿を乾燥させる。

[0066] 続いて、上記(2-8)で乾燥された沈殿を、TE 100 μ lまたはMilliQ grade RNase Free H₂O (あるいは、DEPC処理済みRNase Free H₂O) 100 μ lに溶解させることによってDNAの抽出を行った。

[0067] 一方、RNAの抽出については下記(3-1)～(3-16)の手順に従って実施した。

- (3-1) : DNaseI Buffer 300 μ l で上記 (2-8) で得られた沈殿を溶解する。
- (3-2) : (3-1) 記載の溶液に、5U DNaseI を加える。
- (3-3) : (3-2) 記載の溶液を、25℃で30分間静置する。
- (3-4) : (3-3) 記載の溶液を、17,400 $\times$ g 10分間 遠心分離を行う。この時、遠心分離の停止は緩やかに行う (soft brake)。
- (3-5) : (3-4) 記載の遠心分離後の上澄み液を、別の2ml容 遠心チューブに移す。ここで、沈殿の沈降度が緩い場合は再度遠心分離を行う。
- (3-6) : (3-5) 記載の上澄み液に、RNA Extraction Buffer を1250 μ l 加え、よく混ぜる。
- (3-7) : (3-6) 記載の溶液を、半分に (775 μ l ずつに) 分け、2ml容 遠心チューブに移す。
- (3-8) : (3-7) の工程で半分に分けたそれぞれの溶液に、625 μ l Phenol/TE および625 μ l Chl/iso を加える。
- (3-9) : (3-8) 記載の溶液を遠心分離し、遠心分離により得られた上澄み液に1250 μ l Chl/iso を加える。
- (3-10) : (3-9) 記載の溶液を遠心分離し、遠心分離により得られた上澄み液に1000 μ l Glycogen を加える。
- (3-11) : (3-10) 記載の溶液に、1000 μ l 2-プロパノール (「2PrOH」と表記する) を加えて混ぜる。
- (3-12) : (3-11) 記載の溶液を室温で3分間放置する。
- (3-13) : (3-12) 記載の処理後の溶液を氷上で3分間放置する。
- (3-14) : (3-13) 記載の処理後の溶液を、17,400 $\times$ g 10分間、0℃で遠心分離を行う。
- (3-15) : (3-14) 記載の遠心分離により得られた沈殿を70% (v/v) EtOH (約1ml) で洗った後に乾燥させる。
- (3-16) : (3-15) 記載の工程により得られた沈殿を、MilliQ grade RNase Free H₂O あるいはTE 10~20 μ l に溶解する。

[0068] 図1には、上記の(2-8)の手順において得られた沈殿を溶解した試料について、

0. 2%PVPPを含有する1%アガロースゲル電気泳動を行った結果を示す。なお、図1において、レーン1, 2が MgCl_2 を用いて上記の手順で核酸抽出操作を行った場合に得られた試料であり、レーン3, 4が同じ土壌試料について MgCl_2 を用いないで上記の手順で核酸抽出操作を行った場合に得られた試料である。

[0069] 図1に示すように、 MgCl_2 を用いたレーン1, 2の試料には、矢印で示す部分に腐植に由来するバンドが確認されず、腐植が完全に除去できたことが確認された。一方、 MgCl_2 を用いなかったレーン3, 4の試料には、矢印で示す部分に腐植に由来するバンドが確認された。このことから、 MgCl_2 を用いなければ、腐植を完全に除去することができないということがわかった。

[0070] 図2には、上記の(2-8)の手順において得られた沈殿を溶解した試料について、0. 2%PVPPを含有する1%アガロースゲル電気泳動を行った後に、ゲルをSYBR Green Iで染色した結果を示す。図2において、レーンM:マーカー(λ HindIII digest)、レーン1~3:褐色森林土由来の土壌試料、レーン4~6:泥炭土由来の土壌試料である。また、レーン1, 4は、 MgCl_2 を用いないで核酸抽出操作を行ったものであり、レーン2, 3, 5, 6は、 MgCl_2 を用いて核酸抽出操作を行ったものである。なお、レーン2と3、および、レーン5と6は、それぞれ同じ試料である。

[0071] 図2に示すように、 MgCl_2 を用いないで核酸抽出操作を行ったもの(レーン1, 4)では、腐植が依然として混入していることが確認された(同図中矢印で示す)。一方、 MgCl_2 を用いて核酸抽出操作を行ったもの(レーン2, 3, 5, 6)では、腐植がほぼ完全に除去されたことがわかった。

[0072] また図4に、上記(3-16)の手順において得られた土壌由来のRNAを用いて、RT-PCR-DGGEを行った結果を示す。RT-PCR-DGGEによれば試料中にRNAが存在しない場合は増幅されないことから、増幅産物が確認されれば、それはRNA由来の増幅産物であることがわかる。すなわち、RT-PCR-DGGEの結果、増幅産物が確認されれば、試料中にRNAが存在していることが確認できる。

[0073] 図4は、得られた試料の一部をRT反応(reverse transcriptase)によって16S rDNA配列に関して増幅した後に、わずかに異なる塩基配列(異なる微生物種に由来する)を検出するために、その一部の領域をPCRによって再度増幅し、DGGE法(変成剤ゲ

ル密度勾配法)によって10%アクリルアミドゲルで分離した結果である。図4のレーンMは、既知の微生物を鋳型として増幅したものを流したものであり、レーン1～3はルーピンの根圏土壌を用い(3-16)の手順において得られた試料を鋳型とした場合の結果であり、レーン4～6はトウモロコシの根圏土壌を用い(3-16)の手順において得られた試料を鋳型とした場合の結果であり、レーン7～9はナタネの根圏土壌を用い(3-16)の手順において得られた試料を鋳型とした場合の結果であり、レーン10～12はビートの根圏土壌を用い(3-16)の手順において得られた試料を鋳型とした場合の結果である。図4のレーン1～12のそれぞれにおいて、明確な複数のバンドが検出されており、本実施例の手法によって複数の微生物由来のRNAが土壌から効率的に抽出され、腐植による増幅の阻害も認められないということが明らかとなった。

[0074] [実施例2]

実施例2では、下記の手順によって土壌試料中からRNAの抽出を行った。なお、この実施例で用いた操作手順は、非特許文献2に記載の方法に準じたものである。

[0075] まず、非特許文献2に記載の方法に準じてRNA安定化剤を土壌に添加し、磨碎し、抽出液を添加して核酸(DNA、RNA)溶液を回収した。等量のクロロホルムで脂溶性の化合物を除去した後に、0.6 volの2PrOH(2-Propanol)で沈殿を得た。ここまでの手順については、非特許文献2に記載の方法に従って行った。

[0076] 続いて、下記の(4-1)～(4-12)の手順で操作を行った。

(4-1) : 0.75ml MilliQ grade RNase Free H_2O (あるいは、DEPC処理済みRNase Free H_2O) で、上記沈殿をまず溶解する。

(4-2) : (4-1) 記載の溶液750 μl に、797 μl の比率で20% (w/v) PEG/NaCl溶液を加える。

(4-3) : (4-2) 記載の溶液を、37°Cで一時間静置する。

(4-4) : (4-3) 記載の溶液を、17,400 $\times g$ 30分間遠心分離を行う。

(4-5) : (4-4) 記載の遠心分離により得られた沈殿を70% (v/v) EtOHで洗浄した後、乾燥させて沈殿を回収する。

(4-6) : (4-5) で得られた沈殿を0.5ml MilliQ grade RNase Free H_2O (あるいは

、DEPC処理済みRNase Free H_2O)で溶解した後に、0.5ml 1M $MgCl_2$ を加え、よく混ぜる。

(4-7) : (4-6)記載の溶液を、 $17,400 \times g$ で10分間遠心分離(温度は $4^\circ C$)を行った後、上澄み液を回収する。

(4-8) : (4-7)記載の上澄み液を、 $17,400 \times g$ で10分間遠心分離(温度は $4^\circ C$)を行った後、上澄み液を回収する。

(4-9) : (4-8)記載の上澄み液を、2PrOHで沈殿させる(上澄み液に対して0.6 vol 2PrOHを上澄み液に添加し、 $0^\circ C$ で10分間静置後、 $17,400 \times g$ 、 $0^\circ C$ の条件で、20分間遠心分離を行う)

(4-10) : (4-9)で得られた沈殿を0.5ml TEに溶解する。

(4-11) : (4-10)で得られた溶液に、10M LiCl 0.5mlを加える。 $-80^\circ C$ で上記溶液を1時間放置した後、 $17,400 \times g$ 、 $0^\circ C$ の条件で10分間遠心分離を行った後、沈殿を回収する。

(4-12) : (4-11)で得られた沈殿を、水あるいはTEに溶解する。さらにRNAの純度を高める場合にはDNaseI処理を行う。

[0077] 続いて、下記の手順で核酸抽出を行った。なお、本実施例では、下記の試験試薬としてマグネシウム塩を含む溶液として、0.5M塩化マグネシウム溶液、または、0.5M硫酸マグネシウム溶液を使用した。また、比較のためにマグネシウム塩以外の金属塩(図3参照)を含む水溶液を濃度0.5Mに調製して試験試薬として使用した。

[0078] 以下に、手順を示す。

(5-1) : $-80^\circ C$ に保存しておいた2PrOH(Iso-propanol)沈殿後の核酸ペレット(上記(4-11)で得られた沈殿)を22 μl の MilliQ grade RNase Free H_2O (あるいは、DEPC処理済みRNase Free H_2O)に溶解させる。

(5-2) : (5-1)記載の溶液の2 μl を、10倍希釈して吸光度を測定する。

(5-3) : (5-1)記載の溶液のうち、残りの20 μl を、10 μl ずつ新しい2 ml 容 遠心チューブに移す。

(5-4) : (5-3)記載の遠心チューブに、800 μl の試験試薬を加え良く混合する。

(5-5) : (5-4)記載の溶液を、4℃、17,400×g、の条件で、10分間、遠心分離を行う。この時、遠心分離の停止は緩やかに行う(soft brake)。

(5-6) : 上澄み液を新しい2 ml容 遠心チューブに移し、PEG/NaCl溶液を850 μ l 加え、よく混合する。

(5-7) : (5-6)記載の溶液を37℃で1時間保温する。

(5-8) : (5-7)記載の溶液を、17,400×g、30分間(室温)で遠心分離を行う。

(5-9) : (5-8)記載の遠心分離後、上澄み液を捨て、沈殿(ペレット)を70% (v/v) EtOHでリンスする。

(5-10) : (5-9)で得られた沈殿を減圧遠心乾燥機で乾燥させる。

(5-11) : (5-10)で得られた沈殿を、10 μ l のMilliQ grade RNase Free H₂O (あるいは、DEPC処理済みRNase Free H₂O)に溶かして吸光度を測定する。

[0079] 図3には、上記試験試薬に用いた各化合物、各試験試薬の調製方法、および、実験結果を示す。図3の1, 2は、マグネシウム塩を用いた試験試薬であり、図3の3~21は、マグネシウム塩以外の金属塩を用いた試験試薬である。なお、図3に示す「ろ過滅菌」の項目は、実施例において作製した各溶液の除菌方法を示すものであり、「オートクレーブ」は、通常の方法でオートクレーブを行ったもの、「ろ過滅菌」は、作製した溶液をポアサイズ0.22 μ mのフィルターを用いてろ過して除菌したものを、それぞれ示す。

[0080] 本実施例の結果において、図3の「6:Na₂CO₃」および「9:K₂CO₃」については、PEG沈後のペレットは「なし」と示しているが、(5-9)の工程において70% (v/v) EtOH (エタノール)でリンスした後に少量の沈殿(ペレット)が確認された。

[0081] 試験試薬を添加した後に腐植が溶けないもの(すなわち、図3の「遠心後のペレット」の項目において「あり」のものは、Be塩、Ca塩、Mn塩、Cu塩、Al塩であった。この沈殿には、腐植が含まれていると考えられる。なお、Mg塩を溶液に加えた場合には、溶液が茶色に着色し、フロック状の塊は確認されなかった。しかし、その後の遠心分離操作によって腐植の沈殿が発生し、当該沈殿を除去することができた。

[0082] 図3に示す「試薬添加後の腐植」の項目において、「可溶」とはフロック状の塊がないもののことを指し、「不溶」とはフロック状の塊があるもののことを指している。そのた

め、Mg塩($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)の結果については、図3の「試薬添加後の腐植」の欄は「可溶」と記載している。つまり、図3において、「遠心後のペレットあり」のものが、試験試薬を加えたことによって腐植が沈殿したものを指す。また、「PEG沈後のペレットあり」のものが、腐植を除去した上澄み液についてPEGを添加したことによって核酸が沈殿したものを指す。

- [0083] したがって、図3において、「遠心後のペレットあり」であり、かつ「PEG沈後のペレットあり」に該当する化合物が、土壌試料から腐植を除去することができ、かつ核酸を抽出することができたものに相当する。つまり、上記の結果から、試料中から腐植をうまく除去することができたのは、Mg塩($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)のみであることが確認された。ただし、 MgSO_4 は、 MgCl_2 よりも腐植を除去する効果が小さかった。

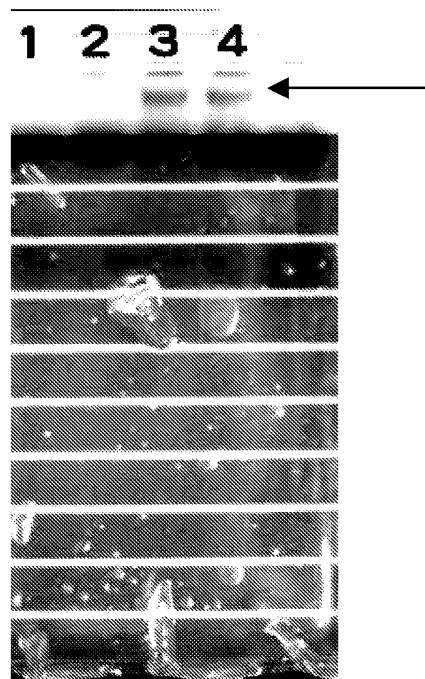
産業上の利用可能性

- [0084] 本発明によれば、土壌、河川沈殿物、汚泥、胃腸内内容物、糞便などといった腐植を多量に含んでいる試料中から、安価かつ簡便に腐植を除去して核酸を精製することができる。そのため、本発明を利用すれば、腐植を含む試料中から核酸(DNA、RNA)を抽出し、これらを解析することができる。具体的には、DNAを抽出した場合には、このDNAを、PCR、PCR-DGGE、制限酵素処理、クローンライブラリーの作製などに利用することができる。また、RNAを抽出した場合には、このRNAを、RT-PCR、RT-PCR-DGGE、クローンライブラリーの作製、マイクロアレイを用いた試験などに利用することができる。さらに、本発明の核酸抽出方法は、土壌中のDNA、RNAのFISH解析への応用に利用することもできる。

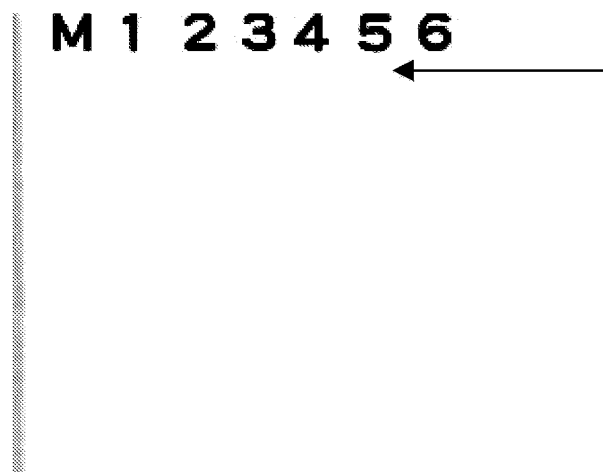
請求の範囲

- [1] 腐植と核酸とを少なくとも含む試料から核酸を抽出する核酸抽出方法であって、
上記試料を、マグネシウム塩を含む水溶液と混合する混合工程と、
上記混合工程によって生じた腐植を含む沈殿を除去して核酸を抽出する除去工程と、を含んでなることを特徴とする核酸抽出方法。
- [2] 上記マグネシウム塩は、塩化マグネシウム、または硫酸マグネシウムの何れかであることを特徴とする請求項1に記載の核酸抽出方法。
- [3] 上記水溶液におけるマグネシウム塩の濃度は、約0.5～約1.0mol/Lであること
を特徴とする請求項1に記載の核酸抽出方法。
- [4] 上記除去工程の後に、塩化リチウム溶液を上記試料に添加する添加工程をさらに
含むことを特徴とする請求項1に記載の核酸抽出方法。
- [5] 腐植と核酸とを少なくとも含む試料から核酸を抽出するために用いられる核酸抽出
剤であって、
マグネシウム塩を少なくとも含むことを特徴とする核酸抽出剤。
- [6] 腐植と核酸とを少なくとも含む試料から核酸を抽出するために用いられる核酸抽出
用キットであって、
マグネシウム塩およびCTABを少なくとも含むことを特徴とする核酸抽出用キット。

[図1]



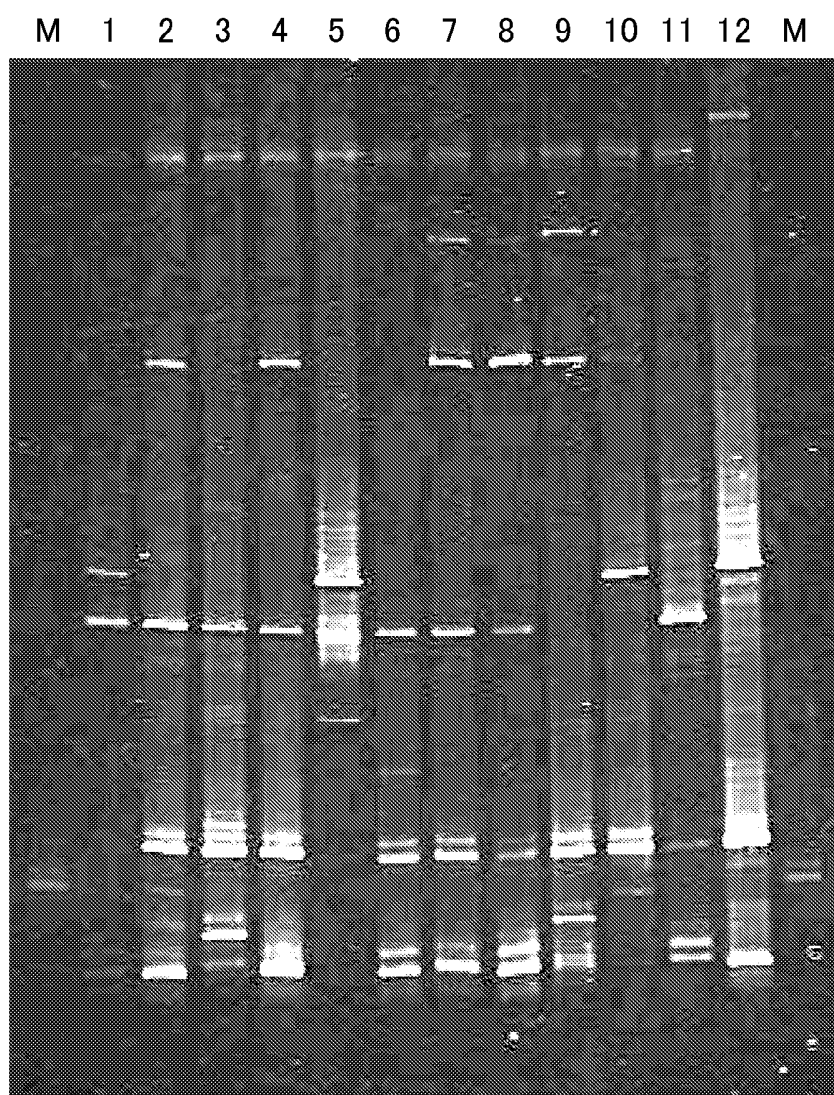
[図2]



[図3]

	元素	化合物	分子量	溶かした量 (g)/50 ml	ろ過減菌	試薬添加後の腐植	遠心後の ペレット	PEG沈後 のペレット
1	Mg	MgCl ₂ ・6H ₂ O	203.3	10.1	オートクレーブ	可溶	あり	あり
2	Mg	MgSO ₄ ・7H ₂ O	246.47	12.3	ろ過減菌	可溶	あり	あり
3	Li	LiCl	42.39	2.1	オートクレーブ	可溶	なし	あり
4	Li	Li ₂ SO ₄ ・H ₂ O	127.96	6.4	ろ過減菌	可溶	なし	あり
5	Na	NaCl	58.44	2.9	オートクレーブ	可溶	なし	あり
6	Na	Na ₂ CO ₃	105.99	5.3	ろ過減菌	可溶	なし	なし
7	Na	Na ₂ SO ₄	142.04	7.1	ろ過減菌	可溶	なし	あり
8	K	KCl	74.55	3.7	オートクレーブ	可溶	なし	あり
9	K	K ₂ CO ₃	138.21	6.9	ろ過減菌	可溶	なし	なし
10	K	K ₂ SO ₄	174.26	8.7	ろ過減菌	可溶	なし	あり
11	Be	BeSO ₄ ・nH ₂ O	105.08	5.2	オートクレーブ	不溶(沈殿形成)	あり	なし
12	Ca	CaCl ₂	110.98	5.5	ろ過減菌	不溶(よく見ると沈殿あり?)	あり	少量あり
13	Ca	FeCl ₃ ・6H ₂ O	270.3	13.5g/25ml	ろ過減菌	不溶(沈殿形成)	あり	なし
14	Mn	MnCl ₂ ・4H ₂ O	197.91	9.9	オートクレーブ	不溶(沈殿形成)	あり	なし
15	Mn	MnSO ₄ ・5H ₂ O	241.08	12.1	オートクレーブ	不溶(よく見ると沈殿あり?)	あり	なし
16	Cu	CuCl ₂ ・2H ₂ O	170.48	8.5g/25ml	ろ過減菌	不溶(沈殿形成)	あり	なし
17	Cu	CuSO ₄ ・5H ₂ O	249.69	12.4g/25ml	ろ過減菌	不溶(沈殿形成)	あり	なし
18	Cu	ZnSO ₄ ・7H ₂ O	287.58	14.3	オートクレーブ	不溶(沈殿形成)	あり	なし
19	Al	AlCl ₃ ・6H ₂ O	241.43	12.1	オートクレーブ	不溶(沈殿形成)	あり	なし
20	Al	Al ₂ (SO ₄) ₃ 14~18H ₂ O	630	31.5	オートクレーブ	不溶(沈殿形成)	あり	なし
21	control	H ₂ O			オートクレーブ	可溶	なし	あり

[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/302562

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00 (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG) , JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HURT RA et al., Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments, Appl.Environ. Microbiol., 2001, Vol.67, No.10, pages 4495 to 4503	1-6
A	BURGMANN H. et al., mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of nifH gene expression by Azotobacter vinelandii in soil, Appl.Environ.Microbiol., 2003, Vol.69, No.4, pages 1928 to 1935	1-6
P,A	SALEH-LAKHA S. et al., Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges, J.Microbiol. Methods, 2005, Vol.63, No.1, pages 1 to 19	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 May, 2006 (09.05.06)

Date of mailing of the international search report
16 May, 2006 (16.05.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00 (2006.01)			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00 (2006.01)			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2006年 日本国実用新案登録公報 1996-2006年 日本国登録実用新案公報 1994-2006年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/WPI (DIALOG)、JSTPlus (JDream2)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	HURT RA et al, Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments, Appl Environ Microbiol, 2001, vol.67, no.10, p.4495-4503	1-6	
A	BURGMANN H et al., mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of nifH gene expression by Azotobacter vinelandii in soil, Appl Environ Microbiol, 2003, vol.69, no.4, p.1928-1935	1-6	
PA	SALEH-LAKHA S et al., Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges, J Microbiol Methods, 2005, vol.63, no.1, p.1-19	1-6	
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 09.05.2006		国際調査報告の発送日 16.05.2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 光本 美奈子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 9359