

環境 DNA 調査・実験マニュアル

Ver. 2.2 (2020 年 4 月 3 日発行)

一般社団法人環境 DNA 学会

© 2020 一般社団法人環境 DNA 学会

© 2020 The eDNA Society

目次

1. はじめに	3
2. 調査地点の選定	6
2-1. 河川における調査地点の選定	6
2-2. 池や湖沼における調査地点の選定	8
2-3. 海岸における調査地点の選定	9
3. 採水および濾過	12
3-1. 採水とカートリッジ式フィルターを用いた現場濾過	13
3-1-1. フィールドデータの記録	15
3-1-2. 採水およびシリンジを用いた現場濾過	15
3-1-3. アスピレーターを用いた現場濾過	17
3-2. 採水とガラスファイバーフィルターを用いた実験室での濾過	26
3-2-1. フィールドデータの記録	27
3-2-2. 採水および実験室への輸送	28
3-2-3. グラスファイバーフィルターを用いた濾過	29
4. DNA の抽出	33
4-1. カートリッジ式フィルターからの DNA 抽出	34
4-1-1. 実験の準備	35
4-1-2. RNAlater の吸引	35
4-1-3. DNA の抽出	36
4-1-4. DNeasy Blood and Tissue kit を用いた DNA の精製	37
4-2. グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出	47
4-2-1. 実験の準備	47

4-2-2. タンパク質の分解処理	48
4-2-3. DNeasy カラムを用いた DNA の精製	48
5. DNA の分析	57
5-1. リアルタイム PCR による環境 DNA の種特異的な検出・定量	57
5-1-1. 種特異的プライマー（およびプローブ）の設計	57
5-1-2. リアルタイム PCR 実験	58
5-2. MiFish メタバーコーディング	61
5-2-1. ライブラリーの調整ー 1 : 1st PCR	61
5-2-1-1. 1st PCR	64
5-2-1-2. 1st PCR 産物の精製と濃縮	65
5-2-1-3. 精製・濃縮済み 1st PCR 産物の定量と希釈	67
5-2-2. ライブラリーの調整ー 2 : 2nd PCR	69
5-2-2-1. 2nd PCR	71
5-2-2-2. 2nd PCR 産物の切り出し	73
5-2-2-3. 切り出した 2nd PCR 産物の定量	75
5-2-2-4. インデクス関連情報	76
5-2-3. MiSeq を用いた超並列シーケンス	77
5-2-3-1. MiSeq のメンテナンス	78
5-2-3-2. シーケンスの下準備	81
5-2-3-3. ライブラリー濃度の最終調整	82
5-2-3-4. シーケンス開始前後の操作	83

1. はじめに

本マニュアルは環境 DNA 分析手法の普及と標準化を目的として作成された。ここに記された内容は 2020 年（令和 2）年 4 月現在の最新情報であるが、環境 DNA 分析技術は日進月歩のため、常に最新のマニュアル（本マニュアルのアップデート版）を参照することが重要となる。最新のマニュアルは環境 DNA 学会の web ページ (<http://ednasociety.org/>) からダウンロードできる。

環境 DNA 分析は一般的に採水、濾過による環境 DNA の濃縮および抽出、分子生物学的な検出実験といった流れで行われる。環境 DNA の濃縮および抽出法には主として二種類の手法が用いられている。ひとつはカートリッジ式のフィルターを用いた手法、もうひとつはガラスファイバーフィルターを用いた手法である。本マニュアルでは両手法を併記する。また、環境 DNA 検出のための分子生物学的な実験手法としては、リアルタイム PCR を用いた種特異的な「単一種検出法」と、環境 DNA メタバーコーディング手法と呼ばれる特定の分類群（例えば魚類）の次世代シーケンサーを用いた超並列的な「多種同時検出法」がよく用いられる。単一種検出法では特定の対象種を精度良く安価に検出できると考えられる一方で、対象種ごとに検出系を設計する手間がかかる。多種同時検出法では単一種検出法に比べると手間と費用がかかるものの、多種の情報をまとめて得られるという利点がある。このように、単一種検出法と多種同時検出法は相互補完的に用いられる技術である。本マニュアルでは、単一種検出法に関する一般的な事項を記述するとともに、MiFish プライマーを用いた魚類の網羅的検出法に関する具体的な分析法について詳細に記述する。

なお、本マニュアルには標準的な手法を記載しているが、各分析者による感度改善や手間の削減などを目的とした工夫を妨げるものではない。

環境 DNA 分析全体の注意事項

環境 DNA 分析は、環境中の極微量な対象 DNA をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で分析可能な量に増幅して検出・定量する技術である。そのため、組織サンプルに由来する DNA や PCR によって得られた増幅産物のような高濃度の DNA によるコンタミネーション（汚染）は結果に取り返しのつかない影響を及ぼすことが多々ある。確度の高い環境 DNA 分析の実施は、コンタミネーションとの戦いであると言っても良い。そのために、以下のような点に

特に注意する必要がある。

- 1) 実験環境の整備：環境サンプルのような「薄い」DNA を扱う部屋と、PCR 産物のような「濃い」DNA を扱う部屋を物理的に隔離することが重要である。また、実験実施日において作業者は「薄い」DNA を扱う部屋から「濃い」DNA を扱う部屋へと一方通行で作業を行うことを厳守し、コンタミネーションの危険性を可能な限り低減するべきである。
- 2) DNA フリー器具の使用：実験に使う器機は未使用の新品、または残留 DNA を完全にデコンタミネーション（除染）したものをを用いる。デコンタミネーションには次亜塩素酸ナトリウム溶液（例えば、0.1%濃度）への浸漬が有効である。ピペットやチューブラックなどについては、紫外線照射による除染も有効である。オートクレーブは有効であるが、廃液や廃棄物などと同じ機器を用いることは避けたほうが良い。
- 3) 手袋の着用：作業時に触れるあらゆるものからコンタミネーションの危険性があるため、清浄な表面を保つために医療用ゴム手袋などの手袋を着用する必要がある。野外サンプルの採取から DNA 測定までの全工程にわたって手袋を着用し、自らの DNA あるいは手についた食品等に由来する DNA によるコンタミネーションを防ぐ。作業中に手袋にサンプルや試薬等が付着したときにはこまめに交換する。
- 4) フィルターチップの使用：マイクロピペットを介したコンタミネーションを防ぐために、フィルター付きチップの使用が必須である。
- 5) DNA 低吸着製品の使用：DNA は通常のプラスチック製品に吸着する性質があるため、特に保存などには低吸着のマイクロチューブ（Eppendorf 社の DNA LoBind Tube など）などの製品を使用することを推奨する。
- 6) 部屋や機器の清浄：マイクロピペットなどの実験器具、遠心機などの機器類を介したコンタミネーションがありうるので、定期的な洗浄を行うことを推奨する。実験室の掃除も重要である。

本マニュアルに関わる権利と責任の所属について

本マニュアルは一般社団法人環境 DNA 学会の標準化委員会委員および環境 DNA 技術の専門家が参集して作成した。本マニュアルの著作権は一般社団法人環境 DNA 学会に、記載内容に関する責任は、環境 DNA 学会および環境 DNA 技術標準化委員会にある。

環境 DNA 技術標準化委員会（括弧内は担当内容）

委員長 源 利文 神戸大学大学院人間発達環境学研究科（全体の編集、および
1 章、2-2 項、3-1 項、4-2 項、5-2 項の執筆）

委員 近藤 倫生 東北大学大学院生命科学研究科（査読）

（五十音順） 清野 聡子 九州大学大学院工学研究院（2-1 項、2-3 項の執筆）

高原 輝彦 島根大学生物資源科学部（査読）

土居 秀幸 兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究科（査読）

中村 圭吾 土木研究所水環境研究グループ（査読）

宮 正樹 千葉県立中央博物館 生態・環境部（3-1 項、4-1 項、5-2 項
の執筆）

山中 裕樹 龍谷大学理工学部（査読）

委員外執筆者 佐土 哲也 千葉県立中央博物館（3-1 項、4-1 項、5-2 項の執筆）

（五十音順） 山本 哲史 京都大学大学院理学研究科（査読）

なお、本マニュアルは環境 DNA 学会の資金により作成された。本委員会は本文の作成について独立した権限を有する。

2. 調査地点の選定

全般的な注意事項

魚市場、店舗、食堂などの産業系の排水には、魚類をはじめとする水生生物の DNA が含まれている可能性が高く、環境 DNA 分析結果の解釈を困難にする原因となる。住宅からの生活排水も同様である。したがって、用排水路、下水処理場、導水路からの流入の影響を受けにくい地点を選ぶことが重要である。特に、下水処理施設は放流量が大きいいため、調査結果への影響が懸念される。処理水の放流口（処理施設と離れていることもある）を確認し、その近傍を避けるようにする。調査地点の選定の際、商業施設や市街地、住宅地は、予め地図や、国土地理院や民間のウェブサイトなどの空中写真からも判別できることが多い。また現地についてからも目視で判断が可能である。

一方、地図や現地の概観的な目視では検出できない施設も要注意である。排水口は堤防下や護岸壁に開口しているため、作業従事者が立っている岸側から見えないことも多い。採水前に水際を歩きながらその存在の有無を確認する。

また、海面や陸上での養殖や蓄養の施設の付近も避けるべきである。そこで飼育している魚類などの DNA を含んだ排水が水域に直接放出されていることが多い。また、餌は地域外で採取された魚類のミンチなどを含む場合も多いため、その水域に生息しない生物を検出してしまう可能性がある。

釣り人とのトラブルもあり得るので、釣り人から離れて採水を行うと良い。また、釣り人による撒き餌の影響も考えられるため、（河川の場合）釣り人の上流側で採水するなど撒き餌の影響を受けないように注意する必要がある。

また、調査に際しては漁業権などの権利関係に配慮し、管理者（場合によっては所有者）と連絡をとって、各種の許認可について確認するべきである。

2-1. 河川における調査地点の選定

環境 DNA が生物分布を反映する距離は、数百 m 程度と見積もられている。そのため、調査地において数百 m おきに調査地点を設定することが理想的である。しかし、それだけの労力を割くことができない場合も多いので、予算規模や目的に応じて適宜調整する必要がある。

河川の合流点付近においては、合流点の上流側で採水を行うとそれぞれの支流における分布を理解する助けとなる。

河川での調査地点の設定時の留意点を挙げる。環境 DNA の流れによる拡散は、さまざまなスケールの地形に影響されるため、マイクロハビタットというスケールでの留意が必要である。また、調査地点の周辺環境もふくめた写真記録も重要である。

- 1) 河川地形：河道の形状により、河川流の流速や土砂の堆積が異なる。河川の蛇行部では、カーブの外側では流速が速く、河岸は侵食的であり、淵が形成され、河畔林の木々がオーバーハングする。また内側では流速が遅く、堆積的で、堆砂により砂州の形成が進み、植生が定着しやすい。その結果、カーブの左右岸で異なる微地形が形成され、それに応じた生態系が存在するので、調査地点の設定時に地形も判断に入れる。例えば、調査地点を距離で河口から〇〇km 地点と設定した場合、直線距離なのか、蛇行を含む流程に沿った距離なのかなども考慮すべきである。
- 2) 河川の流れ：河川の流れは、河道内で一様の流向や流速ではない。中心部を直線的に流れる流心、止水域、渦流発生域とでは、物質のトラップの状態が異なるため、それに応じて水質や生物も異なる。ある地点から放出された環境 DNA は、流速に応じて拡散距離が異なる。
- 3) 河岸構造：自然の植生は、上述のとおり蛇行の左右岸の地形の差異により形成や繁茂状況が異なる。河畔林の下や葦原などの河岸植生の中は良好なハビタットとなっている。一方、護岸や堤防などの人工構造物の場合は、自然のハビタットの改変の度合いに着目する必要がある。特に、コンクリートで隙間なく固められた護岸の場合には、背後地からの地下水の浸出や間隙生物の生息地が失われているなどの影響がありうる。石やブロックを積み上げた護岸の場合、隙間の透水性が着目点である。コンクリートなどで隙間を埋めると、透水性や地下水湧出を前提としたマイクロハビタットが破壊される（例 ミミズハゼ）。堤防の場合も、材料が過去から積まれた粘土か、地中に基礎部分を打設したコンクリートかで透水性が異なる。
- 4) 河床の底質：河床の底質（材料）は、岩、礫、砂、粘土により水の透過性が異なる。例えば、サケ類の産卵場では、堆積した礫の下から水が噴出している。採水作業では、河床材料が粘土など細粒分の多い箇所では細心の注意が必要である。バケツなどの採水器が河床に接触すると、底質の巻き上げが発生し、水が濁って濾過が困難となる。また、河床や河岸が岩の場合には、採水器が岩の突起などにひっかかって回収できなくなる可能性がある。そこで作業従事者が採水器を回収するために無理な動作をすると落水する

危険性があるので注意する必要がある。

- 5) 河川工事などの人為改変：河川管理者（土木行政）の工事による攪乱には注意が必要である。河川流が流下しやすくするための河道掘削では、ハビタットの地形や底質、植生が大きく改変される。特に砂州の除去では、潜砂性魚類のハビタットごと消滅する。モニタリング時に周辺の環境の記録写真を撮影しておくのは、これらの攪乱の検知のためもある。工事の最中には、濁水が発生する。河川水の濁度が上昇すると、採水後の濾過作業に影響する。
- 6) 河口域・汽水域・河川感潮域：河川水と海水の混合の状態に留意すること。同じ地点でも、潮汐により時々刻々環境条件が変化するため、気象庁の公表する潮位表を参考にして状況に応じた調査時刻を設定する。採水時に、地点の位置に加え、潮汐の影響を判断するために、時間、水深、表層・中層・底層なども記載するのが望ましい。塩水遡上や混合のパターンは、河床勾配や河川流量により異なる。海からの河口に向けての強い外力の影響としては、潮位上昇や強波浪による河川への海水流入量の増加と、それに伴う河川水の海への拡散の抑制がある。

2-2. 池や湖沼等における調査地点の選定

流水域である河川に比べると、注意すべきポイントが特段多いわけではないが、その水域を代表する水サンプルを取ることに留意すべきである。小規模な定形の池の場合、どこで採水しても検出率に大きな違いはないと考えられる。任意の地点で、アクセスしやすい岸際から表層水を採取する。複雑な形状をした、あるいは規模の大きな池や湖沼の場合の適切な採水数については知見が不足しているが、できるだけ複数地点で採水することが望ましい。岸の構造や底質の影響、人為改変の影響などについては河川の場合と同様の注意が必要である。

農業用水路で調査を行う場合には下記の点に注意する。下流からのポンプアップや他の地域からのパイプラインによる送水などがありうるため、水がどこからきているのかを確認する。また、灌漑期に水があり、非灌漑期に水がなくなるなど、季節によって水量が異なる場合がある。さらにコンクリート水路は滑りやすく、水の流れも速い場合があるので、事故が起きないように注意する。水路は土地改良区等の団体によって管理されていることから、トラブルを回避するため、調査する場合には了解を得る必要がある。水田や畑からの排水が混ざるので、PCR 阻害要因を含む可能性があることにも留意が必要である。

2-3. 海岸における調査地点の選定

海岸での調査地点の設定時の留意点を挙げる。環境 DNA の流れによる拡散は、さまざまなスケールの地形に影響されるため、マイクロハビタットを考慮したスケールでの留意が必要である。調査地点の周辺環境もふくめた写真記録が重要である。

- 1) 海岸地形と底質：海岸地形により汀線付近の波浪条件が異なり、水際での底質の粒径や波による巻き上がりが異なる。また、バケツなどの採水器が底質に接触すると、砂や泥を水中に巻き上げる。水サンプルの質や濾過作業の効率に影響するため、巻き上げの少ない環境を選ぶのが望ましい。
 - ① 磯や岩場：波による底質の巻き上げが少ないために採水しやすい。波浪が高く、足元が滑りやすいため、落失を防ぐ安全管理がことさら重要になる。
 - ② 砂浜：アクセスは比較的容易だが、汀線（波打際）付近は常に底質を巻き上げているために砂が混入する。
 - ③ 干潟：底質が潮汐により水塊が常時広範囲に移動するために濁水であることが多い。また、河口や一次生産の高い海域であると、植物プランクトンや懸濁物などが多く含まれているため、採水後の濾過の作業効率が低下し濾過水量が減少することが懸念される。
- 2) 沿岸流と水質：沿岸流は、沿岸地形により流向流速が一樣ではない。波浪に曝される磯や砂浜中心部、岬や構造物の周辺の止水域や渦流発生域とでは、水中に存在する物質のトラップの状態が異なるため、それに応じて水質や生物も異なる。ある地点から放出された環境 DNA は、流速に応じて拡散距離が異なることが考えられる。沿岸では、潮汐の影響で水塊が移動、停滞する。河川のように一方向に流下・拡散するのではないことに注意が必要となる。また出水による淡水の影響、停滞の持続、濁度の上昇などの影響にも注意を払う必要がある。
- 3) 海岸生態系構造：海岸の調査地点における周辺の生態系の状態の把握が重要である。とくに海藻・海草の藻場は水生生物が高密度で生息する。これらの繁茂状況は、潜水調査、衛星画像判読で行うことができる。
 - ① 海岸植生は、背後地の環境が、砂浜、砂丘、崖、人工空間（工業用地、市街地、住宅地）により異なる。調査地点付近の広域的な状態の把握は空中写真判読で行える。

- ② 護岸や堤防などの人工構造物の場合は、自然のハビタットの改変の度合いに着目する必要がある。とくに、コンクリートで隙間なく固めた護岸の場合には、背後地からの地下水の浸出や間隙生物の生息地が失われている。
 - ③ 石やブロックを積み上げた護岸の場合、隙間の透水性が着目点である。コンクリートなどで隙間を埋めると、透水性や地下水湧出を前提としたマイクロハビタットが破壊される。堤防の場合も、材料が過去から積まれた粘土か、地中に基礎部分を打設したコンクリートかで透水性が異なる。
- 4) 底質：底質（材料）は、岩、礫、砂、粘土により水の透過性が異なる。採水作業では、干潟や細砂の砂浜など、海岸材料が粘土など細粒分の多い箇所では細心の注意が必要となる。バケツなどの採水器が底に接触すると、底質の巻き上げが発生し、水が濁り、濾過が困難となる。また、磯の岩場の場合には、採水器が岩の突起などに引っかかると回収できなくなる可能性がある。作業従事者が採水器を回収するために無理な動作をすると落水する危険性があるので、安全管理には注意する必要がある。
- 5) 海岸工事など人為改変：海岸管理者（土木行政）や開発事業者などによる工事による攪乱には注意する必要がある。攪乱の規模、継続性など、影響の時空間スケールの把握が必要である。モニタリング時に周辺の環境の記録写真を撮影するのは、これらの攪乱の検知と記録のためである。
- ① 埋め立て工事では、水域自体が消滅するため、モニタリング地点の変更を余儀なくされる場合もある。また、防波堤、突堤など、海中に突き出す構造物では、周辺の流向流速への影響があるため、予め地図で、また、現地で確認する必要がある。このような構造物は、現地に赴いたときに工事が始まっている場合もある。工事の予定は海岸・港湾・漁港管理者に事前に確認は可能である。
 - ② 航路などの海底掘削では、ハビタットの地形や底質、植生が大きく改変される。とくに砂州の除去では、潜砂性魚類のハビタットごと消滅する。
 - ③ 工事の最中には、濁水が発生する。濁度が上昇すると、採水後の濾過作業に影響する。
- 6) 人工構造物（護岸、堤防、防波堤など）：消波や構造維持のための施設は種々あるが、構造物の材料と、岸との距離により留意する必要がある。岸との距離では、構造物の水中にある根固め、水面付近の消波、沖で波浪を軽減する離岸堤がある。材質としてはコン

クリート・ブロックと自然石がある。自然海岸の岩礁と微地形と異なる点は、隙間が多く、時折、透過性が高い点である。打ち寄せた波による水塊がフィルターされる状態となる。離岸堤は沖の小島のような存在である。そのため局所的に岩礁生態系に近い環境が形成される。

3. 採水および濾過

採水の季節

採水の季節について、冬場には環境 DNA の検出率が下がることが報告されているので、採水調査は春～秋に行うと検出率が向上する可能性がある。一方で、季節移動など対象生物種の生態によっては検出しやすい季節や場所があると考えられるので、対象生物の生態情報を把握しておくことは重要である。また、体外受精の生物の場合は繁殖期に環境 DNA 量が著しく増加するため、種特異的検出では対象種の繁殖期を選ぶ、網羅的検出では優占種の繁殖期を避けるなど、対象生物の繁殖期を考慮する必要がある。赤潮やアオコなどの影響で採水サンプル中に高濃度の PCR 阻害物質が混入する場合があるので、このような時期を避けることが望ましい。

安全に採水を行うために

環境 DNA のサンプリング (= 採水) は、季節や場所によってさまざまな環境下で行うことになる。夏には熱中症や日焼け対策が、冬には防寒対策が必要となり、磯や濡れた突堤、貯水池の護岸などでは転倒や落水に注意しなくてはならない。また、水際の作業であるために濡れても良い撥水性や速乾性の高い衣類を着用することも重要である。フィールドでの調査・作業は不測の事態に備えて原則として複数名で行う。さらに、特に海岸や大規模な河川においては安全を確保するためライフジャケットの着用は必須である。万が一、水難事故が起きてしまった場合は、川や池であれば警察へ 110 番に、海であれば海上保安庁のホットライン 118 番に速やかに通報する。

器材、材料、物資の調達 (特に保冷)

調査の器材や物資などの現地調達は出来る限り避ける。沿岸部の人口が少ない地域は、コンビニエンスストアやホームセンターがほとんど無く、品揃えが悪い場合も多い。「氷」が必要な場合は、スーパーマーケット、釣具店、鮮魚店、コンビニエンスストアで調達することになる。このような施設は、魚介類を販売しているため、氷の袋などへの付着などコンタミネーションには十分注意する。瞬間保冷剤の準備があると安心である。「保冷材」をフィールドで保冷、冷凍するために、宿泊施設の冷凍庫を借用、冷蔵庫を利用する場合がある。冷凍庫は食品がストックされていることが多いため、保冷材への付着を回避するためにビニール袋などで覆う必要がある。冷凍のためにドライアイスを用いることもできる。

濾過手法について

水サンプルの濾過については現場で行う場合と、実験室に持ち帰って行う場合がある。濾過のための機材にもカートリッジ式フィルターと、グラスファイバーフィルターがある。ここでは、採水後現場でカートリッジ式フィルターを用いて濾過する手法（3-1）と実験室に持ち帰ってからグラスファイバーフィルターで濾過する手法（3-2）について述べる。

3-1. 採水とカートリッジ式フィルターを用いた現場濾過

安全に採水を行うために（再掲）

環境 DNA のサンプリング（＝採水）は、季節や場所によってさまざまな環境下で行うことになる。夏には熱中症や日焼け対策が、冬には防寒対策が必要となり、磯や濡れた突堤、貯水池の護岸などでは転倒や落水に注意しなくてはならない。また、水際の作業であるために濡れても良い撥水性や速乾性の高い衣類を着用することも重要である。フィールドでの調査・作業は不測の事態に備えて原則として複数名で行う。さらに、特に海岸や大規模な河川においては安全を確保するためライフジャケットの着用は必須である。万が一、水難事故が起きてしまった場合は、川や池であれば警察へ 110 番に、海であれば海上保安庁のホットライン 118 番に速やかに通報する。

フィールドデータの記録に必要な道具（例）

- ・ 測量野帳レベルブック（セ-Y11, コクヨ社など）
- ・ 耐水加圧ボールペン（BDWR-40F-B, パイロットなど）
- ・ ハンドヘルド GPS（eTrex20xJ, ガーミン社など）
- ・ データロガー導電率計（CD-4307SD, マザーツール社など）
- ・ 防水デジタルカメラ（RICOH WG-30, リコー社など）

シリンジを用いた現場濾過に必要な道具（例）

- ・ カートリッジ式フィルター（ステリベクス, 孔径 0.45 μ m, SVHV010RS, メルク・ミリポア社）
- ・ 50ml ロックタイプシリンジ（SS-50LZ, テルモ社）
- ・ パラフィルム（エルエムエス社）
- ・ ルアーフィッティング（VRMP6, 株式会社アイシス, 注入口用）
- ・ ルアーフィッティング（VRSP6, 株式会社アイシス, 排出口用）

- ・ バケツ (Soft Bucket 8 型 I-484, ISETO 社など)
- ・ ロープ (クレモナ金剛打ロープ直径 6mm, ユタカメイク社など)
- ・ ゴム手袋 (パウダーフリー)
- ・ 分子実験用ペーパータオル (61440, 日本製紙クレシア社など)
- ・ RNAlater Solution (Ambion 社)
- ・ 小型スポイト (E-243, 日本メディカルサイエンス)
- ・ 2.0mL チューブ (DNA 低吸着 ; ザルスタット社)
- ・ 医療施設用泡洗浄ハイター1000 400mL (花王)
- ・ 精製水 (精製水 P ワンタッチ式キャップ 500mL, 健栄製薬社など)
- ・ チャック付ポリ袋 140mm × 200mm (ユニパック G-8, 生産日本社)
- ・ チャック付ポリ袋 100mm × 140mm (ユニパック E-4, 生産日本社)
- ・ チャック付ポリ袋 17.7cm × 20.3cm (イージージッパーM, ジップロック社)
- ・ カウンター (数取器, プラス社など)
- ・ 筆記具 (サインペン) (MO-150-MCBK3, ゼブラなど)
- ・ クーラー (ハイパー氷点下クーラーM, ログス社など)
- ・ 保冷剤 (倍速凍結・氷点下パック M, ログス社など)
- ・ 保冷袋 S サイズ (保冷平袋 S, モロフジなど)

アスピレーターを用いた現場濾過に必要な道具 (例)

- ・ カートリッジ式フィルター (ステリベクス, 孔径 0.45 μ m, SVHV010RS, メルク・ミリポア社)
- ・ パラフィルム (エルエムエス社)
- ・ ルアーフィッティング (VRMP6, 株式会社アイシス, 注入口用)
- ・ ルアーフィッティング (VRSP6, 株式会社アイシス, 排出口用)
- ・ 手提げ平角瓶コック付ポリタンク 10L (1-2169-01, アズワン)
- ・ epTIPS スタンダード 1~10mL (30000765, エッペンドルフ社)
- ・ ルアーフィッティング オスルアーロック 4.0mm (VPRM406, 株式会社アイシス)
- ・ ルアーフィッティング メステーパー5.0mm (VRF506, 株式会社アイシス)
- ・ 排気用ゴム管 (6-590-01, アズワン)
- ・ チューブ I 型ジョイント (6-663-02, アズワン)
- ・ 穴付きシリコン栓 (1-7650-07, アズワン)
- ・ アスピレーター (GAS-1, アズワン)
- ・ フィルターホルダーマニホルド (2-258-01, アズワン)
- ・ 液体塩素系漂白剤 (病院用ハイター、花王)

3-1-1. フィールドデータの記録

測量野帳レベルブックに記入する主な項目として以下のようなものがあげられる。これらは調査の目的などに応じて加減して良い。耐水性の野帳に耐水性のボールペンで記録するとよい。

- ・採水者（サンプリングに同行した全員の名前を記録）
- ・日時（YYYY-MM-DDの形式で記録）
- ・測点番号と採水地点の地名（プロジェクト略称+調査番号+測点番号）
- ・緯度経度（35.101252N, 139.293012Eのような10進法が取り扱いやすい）
- ・河岸・湖岸・海岸・底質の分類：砂浜・砂利浜・岩礁・サンゴ・護岸（コンクリート・トラ・捨て石など）
- ・気象・海象（風向・風力・波高を含む）
- ・水温（℃）：携帯用の水質計を用いて計測する。
- ・（海～河川感潮域では）潮汐（大潮・中潮・小潮・若潮・長潮）と干満（満潮・干潮・上げ潮・下げ潮）
- ・（海～河川感潮域では）塩分濃度（‰）：携帯用の水質計を用いて計測する。
- ・透明度（透明・ササ濁り・濁り）
- ・河川で行う場合、わかる場合はダムや発電所の放流量も記録する。
- ・濾過水量（mL）：必ず記入すること。
- ・目視の範囲内で魚影やその他の生物：抽出した環境DNAには魚類以外の生物が含まれているので、クラゲやその他の目立つ生物に関する記録が後々に重要となる。
- ・写真（撮影の有無）
- ・その他：環境水に影響を与えそうなものの記録（釣り人の有無；排水や流れ込みの有無；周囲の水田地域の水管理状況など）

3-1-2. 採水およびシリンジを用いた現場濾過

本項では、シリンジにステリベクスを装填して行う現場濾過法について記す。以下の作業では、コンタミネーション防止のため、常に使い捨ての実験用ゴム手袋を着用すること。手袋は採水地点ごとに取り替える。ここではバケツで採水するケースを説明するが、直接ボトルを用いた採水や、シリンジを用いた直接採水を行っても良い。

- 1) 濾過キットの作成：例えば1採水地点で2本のステリベクスを用いて濾過を行う場合（最大1L x 2本 = 2L）、2組を1セットとしてキットを作成する。ユニパックG-8を用意し、その中に、ステリベクス2本とシリンジ2本を入れる。さらに、RNAlaterが入った2.0mLチューブ2本と小型スポイト2本を小さなユニパック（E-4）にまとめて入れておく。これに、ステリベクスの注入孔と排出孔を閉じるためのルアーフィッティング2個もしくはパラフィルム（1cm x 5cmを6枚ほど）をユニパックE-4に

まとめて入れる。なお、濾過後のステリベクス 2 本を入れるユニパック E-4 を 1 枚キットに入れる (図 3-1-2-1, 2)。

- 2) 採水道具の作成：突堤や防波堤、護岸など水面よりも高い所から採水するため、ロープを 15m ほど切り出しバケツにしっかりと結びつける。Soft Bucket 8 型 I-484 を使用する場合は、取手が抜けることがあるため、本体縁にある穴と取手の 2 箇所にロープを結びつける (図 3-1-2-3)。
- 3) バケツの除染：ゴム手袋を着用し、バケツの内部とバケツにくくりつけたロープ先端部に泡洗浄ハイターを吹き付ける (図 3-1-2-4)。数分間放置した後、ハイターを分子実験用ペーパータオルなどできれいに拭き取る (図 3-1-2-5)。その後、バケツとロープ先端を環境水で 2 回共洗いする。ハイターによる洗浄が不十分だとクロスコンタミネーションの恐れがあり、共洗いが不十分でハイターが余分に残っているとサンプル中の DNA が分解されるので注意すること。
- 4) バケツ採水：ロープの末端を岩や橋の欄干などに結びつけバケツの逸失を防ぐ。バケツを投げ (図 3-1-2-6)、ロープを手繰り寄せて環境水の入ったバケツを回収する (図 3-1-2-7)。データのばらつきを防ぐため、1 回のサンプリングで 10 回のバケツ採水を行いその都度シリンジを用いて 100mL の環境水を濾過する。この操作でシリンジ 1 本あたり 1 L の水を濾過することになる。ただし、環境水の濁度が高い場合は数 100mL で目詰まりが起こり、それ以上濾過できなくなることがある。そのような場合は、濾過水量を記録しておくことが重要になる。
- 5) ステリベクスを用いた現場濾過：バケツに汲んだ環境水を 50mL シリンジで吸引する (図 3-1-2-8)。シリンジには 50mL よりも多めに環境水を吸引させ、シリンジを上向きにしてシリンジ内の空気や余分の水を押し出す。環境水の量を 50mL に調整したらステリベクスを装着して加圧濾過を行う (図 3-1-2-9)。ステリベクスとシリンジの着脱を繰り返すので、その際にルアーロックを締め過ぎないように注意する。同じバケツ採水から濾過を 2 回 (50mL x 2 回 = 100mL) 繰り返したらバケツの水を捨てる。新たに環境水を汲み上げ、濾過総量が 1L に達するまで、この操作を 10 回繰り返す (シリンジでの濾過作業は合計 20 回となる)。単調な作業のため、カウンター (数取り器) を用いて採水回数を間違えないようにする。
- 6) ステリベクス内の水分除去：上記の濾過がすべて終了したら、ステリベクスを取り外してシリンジ内に空気を満たす。再度シリンジにステリベクスを取りつけ、カートリッジ内の水分を押し出す (図 3-1-2-10)。この操作を数回繰り返し、水分をできるだけ除去する。
- 7) ステリベクス排出孔の密閉：ステリベクス内部の水分がほぼなくなったら、ステリベ

クスをシリンジに取りつけたまま、その排出孔をルアーフィッティングかパラフィルムを使って密閉する（図 3-1-2-11）。

- 8) RNAlater の充填：ステリベクスをシリンジから取り外し、小型スポイト（図 3-1-2-12）を使って注入孔から RNAlater を 1-2mL 注入する（図 3-1-2-13）。ステリベクスの注入孔と本体の間に段差があるため、小型スポイトの先端がそれに引っかかると RNAlater がうまく入らない。段差を避けるように奥まで小型スポイト先端を入れるとスムーズに RNAlater を注入できる。
- 9) ステリベクス注入孔の密閉：RNAlater をステリベクスに充填したら、注入孔をルアーフィッティングかパラフィルムを使って密閉する（図 3-1-1-14）。ルアーフィッティングを使用する場合は、固く締め過ぎないように注意する。ステリベクス内のフィルター上に集められた DNA の劣化を防ぐために、この作業までを採水現場で行うのが望ましい。
- 10) 必要事項の記入：濾過が終了後、ステリベクス表面の水分をキムタオルでよく拭う。水分を取り除いた後、サインペンでステリベクスの本体に日付や測点番号など必要事項を記入する（図 3-1-2-15）。
- 11) 濾過済みステリベクスの保管：必要事項の記入が終わった濾過済みステリベクスをユニパック E-4 に入れる。ステリベクスが入ったユニパックをジップロックに入れ、保冷剤が入ったクーラーボックスに入れて冷暗条件で保管し持ち帰る（図 3-1-2-16）。ラボに持ち帰ったステリベクスは-20℃以下で保存する。
- 12) ブランクの作成：フィールドブランクとして、精製水を用いて上記と同様の作業を行ってフィールドブランクを作成する。フィールドブランクの必要性、頻度については各事業主体が慎重に判断するべきである。

3-1-3. アスピレーターを用いた現場濾過

本項では、AC100V の電源がある実験室や船上で大量の水を濾過する場合に有効な方法を記す。濾過には 10L の活栓付きポリタンクを用い、活栓に 10mL のピペットチップを取りつけ、その先端にステリベクスの注入孔をねじ込む。さらに、ステリベクスの排出孔にルアーフィッティングを介してアスピレーターに接続し、吸引濾過により大量の水を濾過する。以下の作業では、コンタミ防止のため、常に実験用ゴム手袋を着用する。

- 1) ポリタンクの除染：ポリタンクの内部に市販の塩素系漂白剤（ハイター）を入れ、実行塩素濃度 0.1%以上になるように現場海水か水道水を入れて調整する（図 3-1-3-1）。ポリタンクをよく振り、その後に濾過する現場海水で 3 回共洗いして漂白剤を除く。

- 2) 濾過装置の組み立て：ポリタンクの活栓に 10mL のピペットチップを連結する（図 3-1-3-2）。ステリベクス排出口にルアーフィッティング（オスルアーロック）を装着する（図 3-1-3-3）。ゴム管をチューブ I 型ジョイントとつなぎ、穴付きシリコン栓を取り付ける（図 3-1-3-4）。フィルターホルダーマニホールドの排出孔とアスピレーターをゴム管でつなく（図 3-1-3-5, 6）。フィルターホルダーマニホールドの吸入孔に前述のゴム管を装着する（図 3-1-3-7）。最後にポリタンクとつなげたチップの先端をステリベクス注入孔に強く押し込む（図 3-1-3-8）と大量濾過システムが完成する（図 3-1-3-9, 10）。
- 3) 濾過：アスピレーターのタンクに水を入れる。除染したバケツなどを使って環境水を採取してポリタンクに入れる。アスピレーターのスイッチを ON にするとポリタンクからアスピレーターに向かって水が流れ、ステリベクスのフィルター上に DNA が吸着・濃縮される。事前にポリタンクに 1L ごとにラインを入れていくと、吸引濾過した水の量を確認しやすい。
- 4) ステリベクス内の水分除去：濾過が終了したら、ステリベクスをピペットチップから取り外し、そのまま吸引濾過を継続すると、ステリベクス内部の水分を除去できる。
- 5) 濾過後のステリベクスの処理：前項の 7) 以降の操作を続けてステリベクスを保管する。

図 3-1-2-1

現場濾過キットの内容：50mL シリンジ 2 本, ステリバクス 2 本, 小型スポイト 2 本, RNAlater が入った 2mL チューブ 2 本, パラフィルム 6 枚, ユニパック (E-4) 1 枚, ユニパック (G-8) 1 枚。



図 3-1-2-2

現場濾過キットをユニパック (G-8) に詰めた状態。このように 1 袋にまとめておくと現場での使い勝手がよい。



図 3-1-2-3

クレモナ金剛打ロープを 15m ほど切り出して折りたたみバケツ (Soft Bucket 8 型 I-484) にしっかりと結びつけたところ。取っ手がとれやすいので、かならずバケツの縁にある小穴にロープの先端をくくりつけておくこと。



図 3-1-2-4

バケツの内部とバケツにくくりつけたロープ先端部に泡洗浄ハイターを吹き付けて除染する。

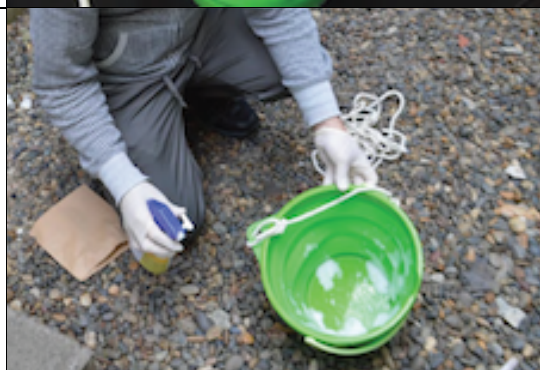


図 3-1-2-5

ハイターを分子実験用ペーパータオルできれいに拭き取る。きれいに拭き取らないと、採水の際に泡が出て環境水を汚染してしまうので注意すること。



図 3-1-2-6

バケツを投げたところ。



図 3-1-2-7

ロープを手繰り寄せて環境水の入ったバケツを回収する。



図 3-1-2-8

50mL シリンジを用いてバケツで汲んだ環境水を吸引する。

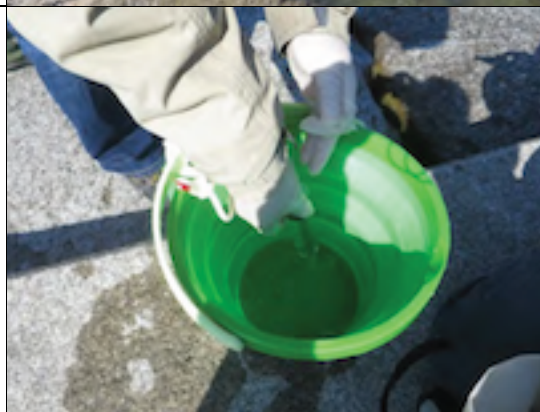


図 3-1-2-9

ステリベクスを装填して加圧濾過を行う。



図 3-1-2-10

濾過が終わったら、ステリベクスを取り外してシリンジ内に空気を満たし、シリンジにステリベクスを再装着し、カートリッジ内の水分を押し出す。この操作をカートリッジから水が出なくなるまで数回繰り返す。



図 3-1-2-11

ステリベクスをシリンジに装着した状態で、排出孔をルアーフィッティングかパラフィルムを使って密閉する。



図 3-1-2-12

小型スポイトをつかい、2.0mL チューブから2~3回に分けて RNAlater を吸引する。



図 3-1-2-13

吸引した RNAlater を注入孔から小型スポイトをつかって注入する。



図 3-1-2-14

注入孔をルアーフィッティングかパラフィルムで密閉する。



図 3-1-2-15

ステリベクスの表面の水分をキムワイブで拭きとり、サインペンでステリベクスの本体に日付や測点番号など必要事項を記入する。



図 3-1-2-16

同じ測点から得られた2本のステリベクスをユニパックに入れ、それをさらにジップロックに入れて、保冷剤が入ったクーラーボックスで保管する。



図 3-1-3-1

ポリタンクの内部に市販の塩素系漂白剤（ハイター）を入れ、実行塩素濃度 0.1% 以上になるように現場海水か水道水を入れて調整する。



図 3-1-3-2

ポリタンクの活栓の先端に 10mL のピペットチップを押し込む。



図 3-1-3-3

ステリベクス排出孔にルアーフィッティング（オスルアーロック）を取りつける。



図 3-1-3-4

ゴム管と穴付きシリコンをチューブ I 型ジョイント（白いジョイント）を介してつなぐ。



図 3-1-3-5

フィルターホルダーマニホールドの排出孔とゴム管をつなぐ。



図 3-1-3-6

ゴム管とアスピレーターをつなぐ。



図 3-1-3-7

フィルターホルダーマニホールドの吸水孔に前述のゴム管を装着する。



図 3-1-3-8

ポリタンクの活栓に取りつけた 10mL ピペットチップの先端をステリベクス挿入口に強く差し込む。



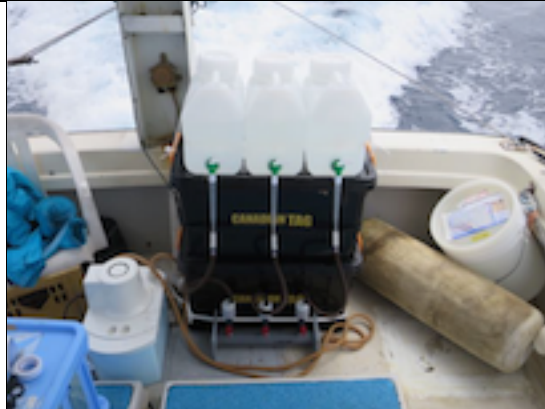
図 3-1-3-9

ステリボックスをつかった大量濾過システムの完成。



図 3-1-3-10

AC100V の電源があれば、写真のように漁船の上でも容易に大量濾過ができる。



3-2. 採水とグラスファイバーフィルターを用いた実験室での濾過

安全に採水を行うために（再掲）

環境 DNA のサンプリング（＝採水）は、季節や場所によってさまざまな環境下で行うことになる。夏には熱中症や日焼け対策が、冬には防寒対策が必要となり、磯や濡れた突堤、貯水池の護岸などでは転倒や落水に注意しなくてはならない。また、水際の作業であるために濡れても良い撥水性や速乾性の高い衣類を着用することも重要である。フィールドでの調査・作業は不測の事態に備えて原則として複数名で行う。さらに、特に海岸や大規模な河川においては安全を確保するためライフジャケットの着用は必須である。万が一、水難事故が起きてしまった場合は、川や池であれば警察へ 110 番に、海であれば海上保安庁のホットライン 118 番に速やかに通報する。

フィールドデータの記録に必要な道具（例）

- ・ 測量野帳レベルブック（セ-Y11, コクヨ社など）
- ・ 耐水加圧ボールペン（BDWR-40F-B, パイロットなど）
- ・ ハンドヘルド GPS（eTrex20xJ, ガーミン社など）
- ・ データロガー導電率計（CD-4307SD, マザーツール社など）
- ・ 防水デジタルカメラ（RICOH WG-30, リコー社など）

採水および研究室への輸送に必要な道具（例）

- | | |
|----------------------------------|------------|
| ・ 採水用ボトル（1L 以上：事前に塩素消毒したもの） | サンプル数 + α |
| ・ 採水用ボトル（1L の純水を入れたもの） | 1 日につき 1 本 |
| ・ 10%塩化ベンザルコニウム溶液（1mL ずつに分注したもの） | サンプル数 + α |
| ・ 使い捨て手袋 | サンプル数 + α |
| ・ 採水用バケツおよびロープ | 1 式 |
| ・ スプレー式塩素系漂白剤 | 1 本 |
| ・ ペーパータオル | 適宜 |
| ・ ゴミ袋 | 適宜 |
| ・ 長靴・胴長等 | |
| ・ 水質計（必要に応じて） | |
| ・ マジック、ガムテープ等 | |
| ・ クーラーボックス | |

- ・保冷剤

グラスファイバーフィルターを用いた実験室での濾過に必要な道具（例）

・フィルターホルダー（事前に塩素消毒したもの[図 3-2-2-1]）	適宜
・アスピレーターまたは真空ポンプ	適宜
・グラスファイバーフィルター（平均孔径 0.7 μ m）	濾過数の 2 倍
・ピンセット（事前に塩素消毒したもの）	適宜
・アルミホイル	適宜
・チャック袋	適宜
・塩素処理用バケツ	適宜
・塩素系漂白剤	適宜
・純水	適宜
・使い捨て手袋	適宜
・冷凍庫（-20 度以下）	

3-2-1. フィールドデータの記録

測量野帳レベルブックに記入する主な項目として以下のようなものがあげられる。耐水性の野帳に耐水性のボールペンで記録するとよい。

- ・採水者（サンプリングに同行した全員の名前を記録）
- ・日時（YYYY-MM-DD の形式で記録）
- ・測点番号と採水地点の地名（プロジェクト略称+調査番号+測点番号）
- ・緯度経度（35.101252N, 139.293012E のような 10 進法が取り扱いやすい）
- ・河岸・湖岸・海岸・底質の分類：砂浜・砂利浜・岩礁・サンゴ・護岸（コンクリート・テトラ・捨て石など）
- ・気象・海象（風向・風力・波高を含む）
- ・水温（ $^{\circ}$ C）：携帯用の水質計を用いて計測する。
- ・（海では）潮汐（大潮・中潮・小潮・若潮・長潮）と干満（満潮・干潮・上げ潮・下げ潮）
- ・（海では）塩分濃度（ $\%$ ）：携帯用の水質計を用いて計測する。
- ・透明度（透明・ササ濁り・濁り）
- ・濾過水量（mL）：1000mL 未満の場合には必ず記入すること。
- ・目視の範囲内で魚影やその他の生物：抽出した環境 DNA には魚類以外の生物が含まれているので、クラゲやその他の目立つ生物に関する記録が後々に重要となる。
- ・写真（撮影の有無）
- ・その他：環境水に影響を与えそうなものの記録（釣り人の有無；排水や流れ込みの有無な

ど)

3-2-2. 採水および実験室への輸送

1) 水辺からの直接採水：直接水辺にアクセスできる場合は、採水ボトルを直接水につけて採水を行う。現場の環境水でボトルを2回、共洗いした後、サンプルを1リットルより少し多めに採取する。コンタミネーション防止のため、共洗いした水は、河川の場合下流側に捨てるなど、共洗いした水がサンプルに混入しないよう注意する(図3-2-2-2)。作業時には底泥を巻き上げないように注意する。採取した水に、DNAの分解抑制のために10%塩化ベンザルコニウム溶液を1mL添加し(終濃度0.01%)、転倒混和を行ってしっかりと混ぜる(図3-2-2-3)。

2) バケツを用いる場合：水辺への直接のアクセスが困難な場合には、バケツを用いて河川水を採取する

(ア)バケツの除染：ゴム手袋を着用し、バケツの内部とバケツにくくりつけたロープ先端部に泡洗浄ハイターを吹き付ける(図3-2-2-4)。数分間放置した後、ハイターを分子実験用ペーパータオルなどできれいに拭き取る(図3-2-2-5)。その後、バケツとロープ先端を環境水で2回共洗いのする。ハイターが余分に残っているとサンプル中のDNAが分解されるので注意すること。

(イ)バケツ採水：バケツを投げ、ロープを手繰り寄せて環境水の入ったバケツを回収する(図3-2-2-6)。採水した水でバケツを2回、共洗いのする。その後採水した水でボトルを2回、共洗いした後、サンプルを1リットルより少し多めに採取する。コンタミネーション防止のため、共洗いした水は、河川の場合下流側に捨てるなど、共洗いした水がサンプルに混入しないよう注意する。採取した水に、DNAの分解防止のために10%塩化ベンザルコニウム溶液を1mL添加し(終濃度0.01%)、転倒混和を行ってしっかりと混ぜる(図3-2-2-3)。

3) フィールドブランク：実験室から運んだ純水が入ったボトルをフィールドで開封し、サンプルと同様に10%塩化ベンザルコニウム溶液を1mL添加し(終濃度0.01%)、転倒混和を行ってしっかりと混ぜる。

4) 実験室への輸送：採水後のサンプルは直射日光および高温をさけて実験室に輸送する。塩化ベンザルコニウムの添加により、常温下でも数日程度はDNAが保存されるが、できるだけ低温での管理が望ましい(ただし、現在のところ、塩化ベンザルコニウムを添加すれば、水サンプルは冷凍させない方が良く考えられている)。また、紫外線はDNAを分解するので、直射日光を避けて輸送する。輸送後、速やかに以下の濾過作業を行う。

3-2-3. グラスファイバーフィルターを用いた濾過

実験室に持ち帰ったサンプルはできるだけ早期に（採水後 48 時間以内を推奨）濾過を行う。濾過を行う者は作業を通じて手袋を着用する。

- 1) 塩素処理の準備：塩素処理用バケツに水道水を入れ、市販の塩素系漂白剤を実行塩素濃度 0.1%以上になるように添加する。
- 2) 道具の塩素処理：フィルターホルダーおよびピンセットは使用前に 5 分以上塩素処理バケツに漬け（図 3-2-3-1）、水道水ですすいだ後、蒸留水ですすいでから使用する。この塩素処理はサンプルが変わるごとに行う必要がある。使用後のボトルはボトル表面も含めて全体を除染する必要があるため、塩素処理バケツに全体を沈めて 5 分以上の塩素除染を行い、次回以降の調査に用いる。
- 3) 濾過：水サンプルの濾過にはグラスファイバー製のフィルター（平均孔径 0.7 μ m）を、1 サンプルにつき 2 枚用いる。サンプル水を 500mL ずつ 1 枚のフィルターで濾過する（図 3-2-3-2 ~ -4）。なお、サンプル水によっては 500mL の濾過が困難な場合がある。そのようなときには、フィルター 1 枚あたりの濾過水量を減らし、複数枚に分けて濾過をし、濾過水量を記録する。濾過水量を減らした場合でもサンプルあたりのフィルター枚数は 2 枚とする。未使用フィルターにサンプル水がかかることによるコンタミネーションを防ぐため、フィルターの容器を開け放しにしないことやサンプル水より高いところにおいておくことなどの注意が必要である。
- 4) フィルターの保存：濾過が終わったフィルターは濾過面を内側にして半分におり、2 枚のフィルターをあわせてアルミホイルで包む（図 3-2-3-5）。アルミホイルにサンプル名などを記入し、ユニパックなどの袋に入れて冷凍庫（-20℃以下）で保存する（図 3-2-3-6）。この状態で数ヶ月程度は安定して保存可能である。
- 5) 濾過ブランク：濾過時以降のコンタミネーションの有無を評価するため、1 日の作業につき 1 回、純水 1 リットルに 10%塩化ベンザルコニウム溶液 1mL を添加（終濃度 0.01%）した「濾過ブランク」を用意し、サンプルと同様に扱う。ただし、「フィールドブランク」で濾過ブランクの代用としても良い。

図 3-2-2-1

採水ボトルは使用前に塩素により除染する。



図 3-2-2-2

共洗い後の環境水は下流側など、サンプルに影響しないところに捨てる。



図 3-2-2-3

採水後、10%塩化ベンザルコニウム溶液を 1mL 添加する。



図 3-2-2-4

バケツの内部とバケツにくくりつけたロープ先端部に泡洗浄ハイターを吹き付けて除染する。

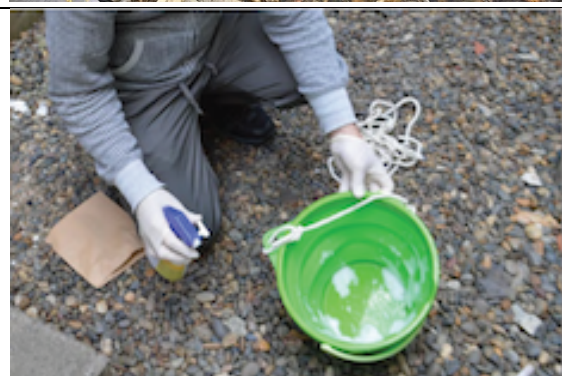


図 3-2-2-5

ハイターを分子実験用ペーパータオルなどできれいに拭き取る。きれいに拭き取らないと、採水の際に泡が出て環境水を汚染してしまうので注意すること。



図 3-2-2-6

バケツを投げ、ロープを手繰り寄せて環境水の入ったバケツを回収する。



図 3-2-3-1

濾過に使用する器材は使用前に塩素により除染する。



図 3-2-3-2

濾過の様子。



図 3-2-3-3

濾過後のフィルターの状態。



図 3-2-3-4

濾過後のフィルターの状態

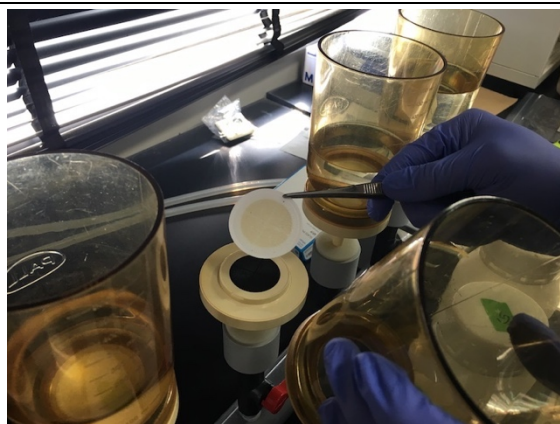


図 3-2-3-5

濾過後のフィルターをアルミホイルで遮光する。



図 3-2-3-6

アルミホイルにサンプル情報等を書き込み、ユニパックなどの袋で冷凍保存する。



4. DNA の抽出

サンプル保管上の注意

カートリッジフィルターまたはグラスファイバーフィルターを用いた濾過の後、サンプルは冷凍庫に保管される。冷凍庫の温度管理には十分な注意を払い、凍結融解を繰り返すことのないように注意する。

DNA 抽出に共通の注意点

以下にカートリッジフィルターからの DNA 抽出 (4-1) およびグラスファイバーフィルターからの DNA 抽出 (4-2) について記す。コンタミネーションのリスクを軽減するために、どちらの作業も、PCR 以降の装置やサンプルと物理的に隔離すること、PCR 以降の操作を行った作業者が同じ日に DNA 抽出以前の操作を行うことのないように、1 日の作業内容・順序を事前に確認することが重要である。

4-1. カートリッジ式フィルターからの DNA 抽出

DNA 抽出を始める前に：コンタミネーションのリスクを減らす方策

本項では、ステリバクスフィルターから DNA を抽出する方法を記す。なお、本手法はビデオジャーナルである Journal of Visualized Science (Miya et al. 2016) に発表した手法を若干改変したもので、一連の技法は動画に収められているので参考にされたい。

また、ここからが実験室での工程となるので、コンタミネーション（外来 DNA の混入）には十分注意を払わなくてはならない。とくに、この段階でコンタミネーションが起これると、以降の実験（リアルタイム PCR や次世代シーケンス用ライブラリーの調整）が台無しになってしまう。そうならないように、DNA 抽出のみの専用の実験室（DNA 抽出室）を設けるべきである。また、DNA 抽出室は PCR 関連の部屋とは空間的に十分隔離しなければならない。さらに、組織からの抽出 DNA や PCR 産物を扱った当日は DNA 抽出室に入らないなどの細心の注意が必要となる。

DNA 抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- ・ 乾熱滅菌器（56℃に設定）
- ・ ミニローター（ACR-100, アズワン）と付属の 10mL/15mL チューブホルダー
- ・ QIAVac Connecting System（QIAvac 24 Plus マニホールドと QIAGEN Vacuum Pump, キアゲン社）¹
- ・ 卓上超遠心機（PZ5557-A000, クボタ社）
- ・ 微量高速冷却遠心機（MX-307, TOMY 社）
- ・ 微量高速冷却遠心機用ローターラック（AR015-24, TOMY 社）
- ・ 卓上小型遠心機（マイクロシックス MS-1, アズワン）
- ・ ボルテックス・ミキサー（VORTEX-GENIE 2 Mixer, エムエス機器株式会社）と 3 インチプラットホーム
- ・ ルアーフィッティング（VPRM406 オスルアーロック 4mmID 用, 株式会社アイシス）
- ・ 50mL コニカルチューブ
- ・ DNeasy Blood and Tissue kit（キアゲン社）
- ・ エタノール（分子生物学用）
- ・ 2.0mL チューブ（DNA 低吸着；ザルスタット社）
- ・ 1.5mL チューブ（DNA 低吸着；ザルスタット社）
- ・ PBS（-）（マグネシウムとカルシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水, 細胞科学研究所）²
- ・ パラフィルム

- ・ ゴム手袋（パウダーフリー）
- ・ マイクロピペット P-5000, P-1000, P-200, P-100（ピペットマン, ギルソン社）
- ・ フィルターチップ（マイクロピペットの容量に合わせて各種）
- ・ ハサミ（パラフィルムを切るためのもの）
- ・ 標準型ピンセット 1 本（IPT-12, アズワン）
- ・ 1.5mL/2mL 用チューブラック

¹ QIAVac を使うかわりに、50mL コニカルチューブと 2.0mL チューブを組み合わせ、卓上超遠心機で RNeasy を抜き取ってもよい（Miya et al. 2016 が参考になる）。

² 本プロトコルでは、DNeasy キットに付属のバッファ-ATL は使用しない。

4-1-1. 実験の準備

実験中は必ずゴム手袋を着用する（これ以降作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する）。

- 1) 乾熱滅菌器を 56℃ に設定する（温まるのに時間がかかるので事前に準備しておく；図 4-1-1-1）。
- 2) RNeasy が充填された濾過済みのステリベクスを準備する（凍結している RNeasy は常温で比較的すぐに解凍できる；図 4-1-1-2）。

4-1-2. RNeasy の吸引

- 1) ステリベクスの排出孔をふさいでいたキャップもしくはパラフィルムを外し、ルアーフィッティング（VPRM406）を取りつける。
- 2) ルアーフィッティングを介して QIAvac 24 Plus マニホールドとステリベクスを接続する（図 4-1-2-1）。
- 3) QIAvac のポンプのスイッチを入れ、注入孔側から排出孔側に向かって RNeasy を吸引する（ステリベクスのカートリッジ内には、構造上の問題で若干の RNeasy が残るが、これ以降の DNA 抽出で問題は生じない）。
- 4) パラフィルムを 1cm × 5cm 程度の大きさに切り、ステリベクスの数だけ用意する（ルアーフィッティング [VRSP6] を使用した場合はパラフィルムは不要）。
- 5) RNeasy を吸引したステリベクスをマニホールドから外し、パラフィルムもしくはルアーフィッティングで排出孔に封をする（図 4-1-2-2；パラフィルムを使用する場合

は、乾熱滅菌器で温めた際にステリベクス内の空気が膨張し、パラフィルムが破れて液漏れすることがあるので、排出孔の部分をフィルムで数回重ねて封をすること)。

4-1-3. DNA の抽出

- 1) DNeasy Blood and Tissue kit と PBS (-) を使って抽出液 (プレミックス) の準備をする (図 4-1-3-1)。1 本のステリベクスあたり 20 μ L の Proteinase-K (600mAU/ml)、200 μ L の AL、220 μ L の PBS (-) の割合でプレミックスを調整する。これには、DNA 抽出中のコンタミネーションを検知するための「抽出ブランク」用の 1 本分も含める。
- 2) ステリベクスの注入孔を開封し、マイクロピペット (P-1000) と 1000 μ L 用のフィルターチップを用いて上記のプレミックスを充填する (注意: 注入孔とカートリッジの接合部に段差があるため、チップ先端の挿入具合によって液が溢れ出ることがある; 図 4-1-3-2)。
- 3) パラフィルムを 1cm \times 5cm 程度の大きさに切り出し、ステリベクスの注入孔側にしっかりと封をする (注意: ルアーフィッティング [VRMP6] を使用の場合はパラフィルムは不要; 図 4-1-3-3)。
- 4) ミニローテーターの 10mL/15mL チューブホルダーにステリベクスを差し込み、ステリベクスが地面と平行になるようにチューブホルダーをローテーター本体に取り付ける。
- 5) ステリベクスを取り付けたローテーターを乾熱滅菌器内に置き、10rpm で回転させ 56 $^{\circ}$ C で 20 分間加温する (注意: ミニローテーターの耐久温度は 60 $^{\circ}$ C; 図 4-1-3-4)。
- 6) ステリベクスを加温中に DNA 回収用の 2.0mL チューブ (DNA 低吸着) と 50mL コニカルチューブを用意し (図 4-1-3-5)、2.0mL チューブを 50mL コニカルチューブに入れる (注意: 2.0mL のチューブにはキャップに番号など必要事項を記入、コニカルチューブの奥まで押し込まない; 図 4-1-3-6)。
- 7) ステリベクスの加温が終了後、注入孔側のパラフィルムもしくはルアーフィッティングを内部の液が漏れないように注意深く取り外す。
- 8) ステリベクスの注入孔を、コニカルチューブ内に入れた 2.0mL チューブ内に挿入し、そのまま 50mL コニカルチューブの底まで押し込む (図 4-1-3-7)。その後しっかりとコニカルチューブのキャップを閉める (図 4-1-3-8)。
- 9) ステリベクスを入れたコニカルチューブを 6,000g で 1 分間遠心し (図 4-1-3-9)、抽出 DNA を 2mL チューブに回収する (図 4-1-3-10)。

- 10) 50mL コニカルチューブを遠心機から取り出し、ピンセットを使ってステリベクス (図 4-1-3-11)、2.0mL チューブの順に取り出す (図 4-1-3-12 ; 注意 : 2.0mL チューブはキャップが開いた状態なので注意深く扱うこと)。
- 11) 使用済みステリベクスを廃棄し、2.0mL チューブのキャップをしっかりと閉じる。

4-1-4. DNeasy Blood and Tissue kit を用いた DNA の精製

- 1) ステリベクスの本数に抽出ブランク 1 本を加えた本数の DNeasy Blood and Tissue kit (以下 DNeasy) 付属のカラムを用意する (図 4-1-4-1 ; 注意 : カラムのキャップに必要事項を記入すること)。
- 2) 抽出 DNA が入った 2.0mL チューブに 200 μ L の 96~100%エタノールを入れピペットでよく混和する (図 4-1-4-2)。
- 3) マイクロピペット (P1000) の吸引量を 700 μ L にセットし、カラムに抽出 DNA を入れる (注意 : RNAlater が少量残っているため溶液は 640 μ L より多くなることもある ; 図 4-1-4-3)。抽出ブランクには、4-1-3 で用意した混合溶液 440 μ L に 200 μ L の 96~100%エタノールを加えてピペットで混和したものを用いる。
- 4) 溶液が入ったカラムを 6,000g で 1 分間遠心する (図 4-1-4-4)。
- 5) 遠心を終了後、カラムのコレクションチューブを外して新しい 2mL コレクションチューブにカラムに載せ替える (図 4-1-4-5)。使用済みのコレクションチューブは廃棄する (図 4-1-4-6)。
- 6) カラムに 500 μ L の Buffer AW1 を入れ (図 4-1-4-7)、6,000g で 1 分間遠心する。
- 7) 遠心を終了後、カラムを新しい 2mL コレクションチューブに載せ替える (図 4-1-4-8)。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。
- 8) カラムに 500 μ L の Buffer AW2 を入れ (図 4-1-4-9)、20,000g で 3 分間遠心する。
- 9) 新しい DNA 低吸着の 1.5mL チューブを用意し、キャップに必要事項を記入する (図 4-1-4-10)。
- 10) 遠心を終了後、カラムを 9) で用意した 1.5mL チューブに載せ替える (図 4-1-4-11)。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。
- 11) 200 μ L の溶出 Buffer AE (溶出バッファー) をカラムのメンブレン上に注ぎ (図 4-1-4-12)、室温で 1 分間インキュベートした後に 6,000g で 1 分間遠心する。なお、回

収 DNA 濃度が希薄となることが予想される場合には、溶出バッファー量を 50 μ L 程度まで減じることにも可能である。その際は溶出バッファー量を記録しておくこと。

12) 遠心を終了後、カラムを取り外してチューブのキャップをしっかりと閉じる（図 4-1-4-13）。使用済みカラムを廃棄する。

13) この状態で -20°C で安定的に保存可能である。

参考文献

Miya, M., Minamoto, T., Yamanaka, H., Oka, S., Sato, K., Yamamoto, S., Sado, T. & Doi, H. 2016. Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA. *Journal of Visualized Experiments*, (117):e54741. doi: 10.3791/54741

なお、本論文のビデオについては

<https://sites.google.com/site/masakimiyalab/publications-1>

から低解像度版の視聴が可能である。

図 4-1-1-1

乾熱滅菌器を 56℃にセットする。指定の温度に達するまで時間がかかるので、抽出前に余裕をもってセットすること。



図 4-1-1-2

-20℃に凍結してあったステリベクスを解凍する。冷蔵の場合はそのままよい（図 4-1-1-2）。



図 4-1-2-1

ステリベクスの排出孔を開封し、ルアーフィッティングを介して QIAvac と接続し、ステリベクス内に充填した RNAlater を抜き取る。

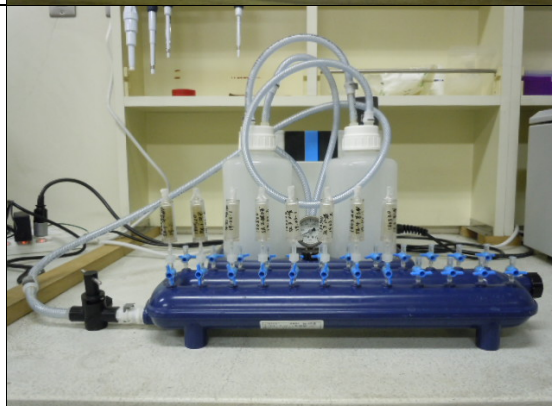


図 4-1-2-2

再度、パラフィルムでステリベクスの排出孔を閉じる。

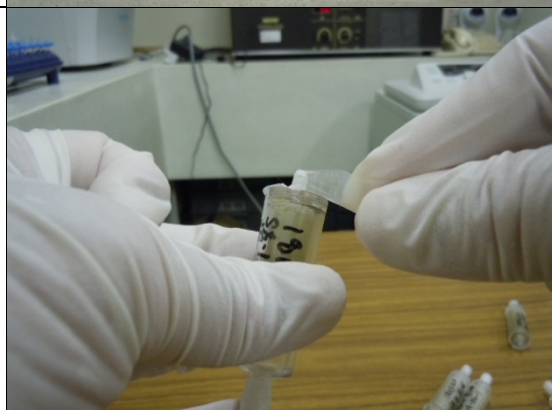


図 4-1-3-1

抽出に必要な試薬を準備する。



図 4-1-3-2

ステリベクスの注入孔を開封し、マイクロピペット (P-1000) と 1000 μ L 用のフィルターチップを用いて上記のプレミックスを充填する。



図 4-1-3-3

パラフィルムでステリベクスの注入孔に封をする。ステリベクスを 56 $^{\circ}$ C に加熱する際、液が膨張するのでしっかり封をすること。



図 4-1-3-4

ステリベクスを取り付けたローターを乾熱滅菌器内に置き、10rpm で回転させ 56 $^{\circ}$ C で 20 分間加温する。



図 4-1-3-5

ステリベクスを加熱中に DNA 回収用の 2.0mL チューブ (DNA 低吸着) と 50mL コニカルチューブを用意する。



図 4-1-3-6

2.0mL チューブを 50mL コニカルチューブに挿入したところ。



図 4-1-3-7

ステリベクスの注入孔を 2.0mL チューブ内に挿入し、そのまま 50mL コニカルチューブの底まで押し込む。



図 4-1-3-8

ステリベクスと 2.0mL チューブをコニカルチューブの底に押し込んだら、しっかりとコニカルチューブのキャップを閉める。

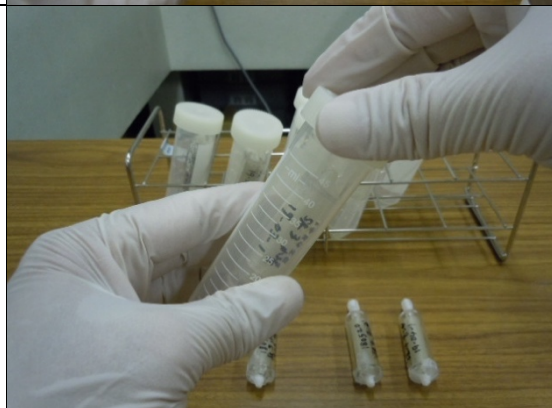


図 4-1-3-9

ステリベクスを入れたコニカルチューブを
6,000g で 1 分間遠心する。



図 4-1-3-10

コニカルチューブ内で 2.0mL チューブに
回収された抽出 DNA。



図 4-1-3-11

ピンセットを使ってコニカルチューブから
ステリベクスを取り出す。

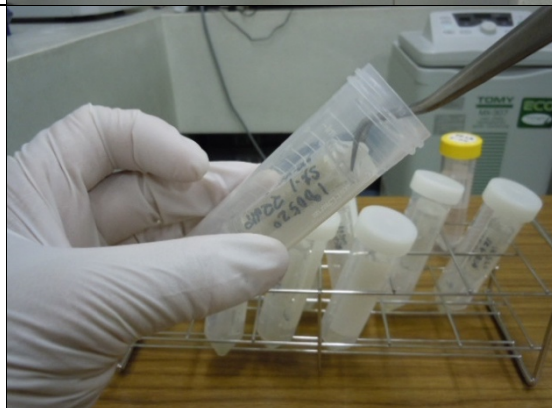


図 4-1-3-12

次いでピンセットを使ってコニカルチューブ
から 2.0mL チューブを取り出す。キャ
ップが開いたままなので注意深く取り出す
こと。

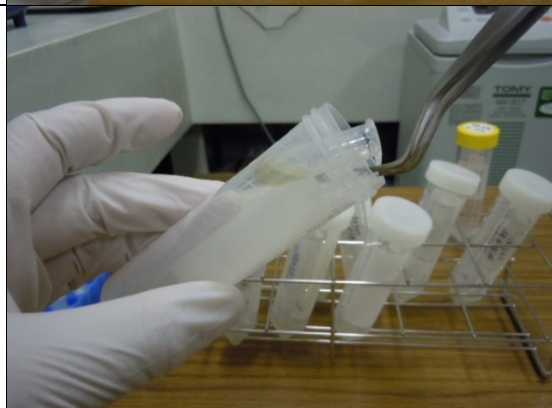


図 4-1-4-1

DNeasy Blood and Tissue kit 付属のカラム（コレクションチューブ付き）を開封してチューブラックに並べる。

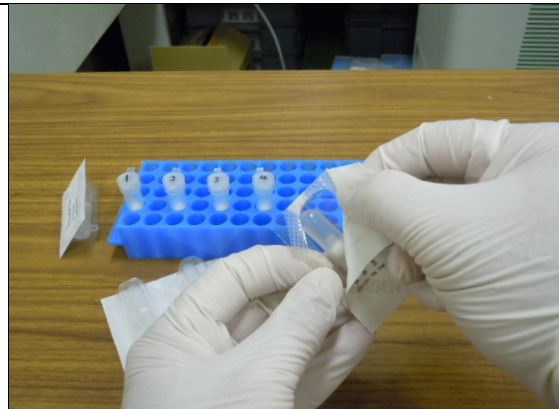


図 4-1-4-2

抽出 DNA が入った 2.0mL チューブに 200 μ L の 96~100%エタノールを入れピペットでよく混和する。

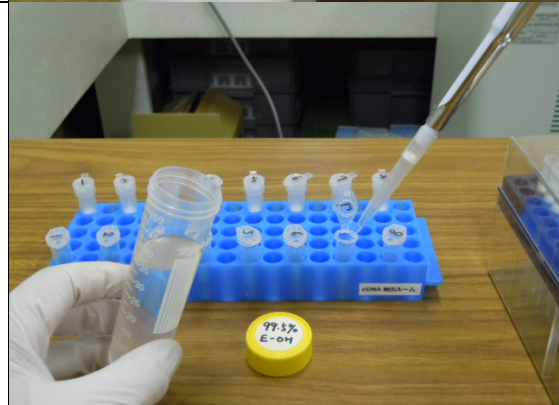


図 4-1-4-3

カラムに抽出 DNA を入れる。

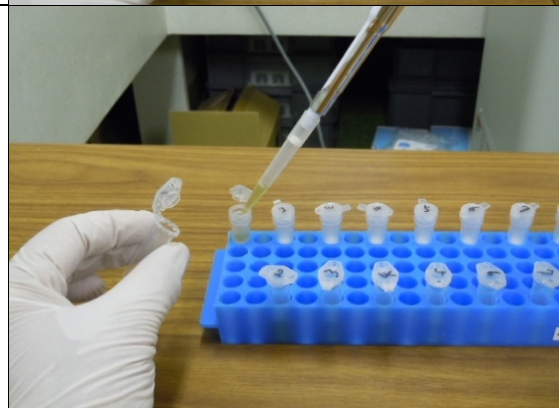


図 4-1-4-4

抽出 DNA が入ったカラムを 6,000g で 1 分間遠心する。



図 4-1-4-5

遠心を終了後、カラムのコレクションチューブを外して新しい2mLコレクションチューブにカラムに載せ替える。

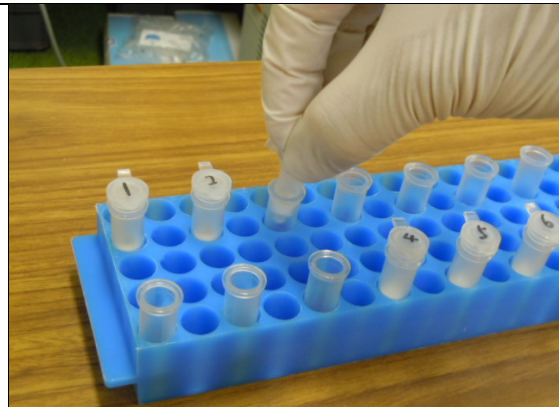


図 4-1-4-6

使用済みのコレクションチューブは廃棄する。



図 4-1-4-7

カラムに 500 μ L の Buffer AW1 を入れる。



図 4-1-4-8

遠心を終了後、カラムを新しい2mLコレクションチューブに載せ替える。



図 4-1-4-9

カラムに 500 μ L の Buffer AW2 を入れる。

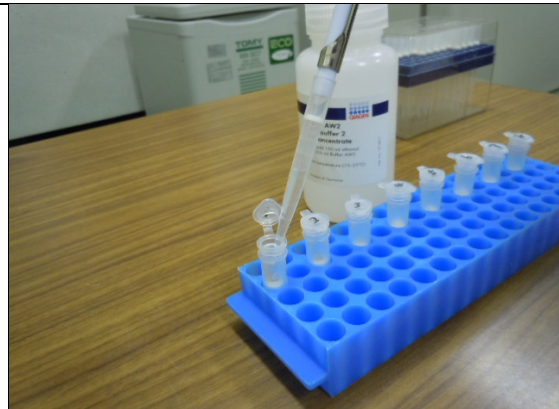


図 4-1-4-10

DNA 低吸着の 1.5mL チューブを用意し、
キャップに必要事項を記入する。



図 4-1-4-11

遠心を終了後、カラムを図 4-1-4-10
で用意した 1.5mL チューブに載せ替え
る。

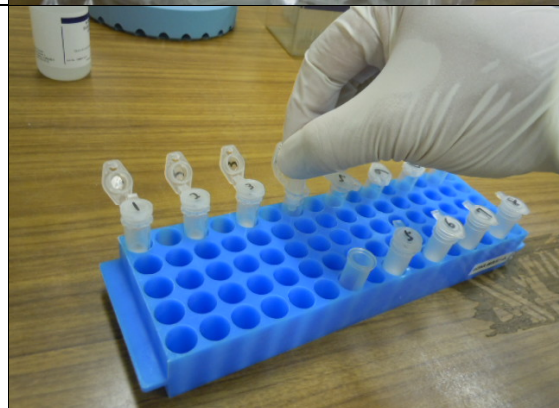


図 4-1-4-12

200 μ L の溶出 Buffer AE (溶出バッファ
ー) をカラムのメンブレン上に注ぐ。



図 4-1-4-13

室温で1分間インキュベートした後に
6,000gで1分間遠心する。



図 4-1-4-13

遠心を終了後、カラムを取り外してチューブのキャップをしっかりと閉じる。

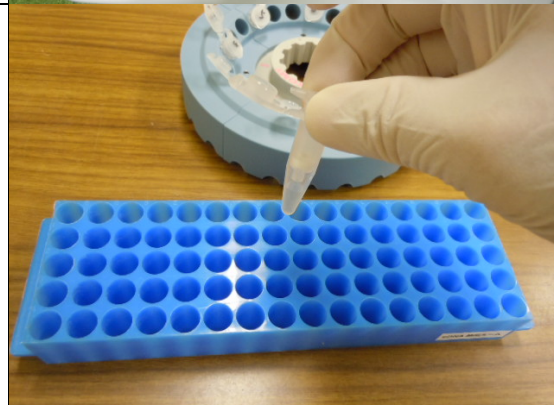


図 4-1-4-14

この状態で-20℃で安定的に保存可能である。



4-2. グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出

DNA 抽出を始める前に：コンタミネーションのリスクを減らす方策

本項では、グラスファイバーフィルターから DNA を抽出する方法を記す。なお、本手法は Uchii et al. 2016 に発表した手法を若干改変したものである。

また、ここからが実験室での工程となるので、コンタミネーション（外来 DNA の混入）には十分注意を払わなくてはならない。とくに、この段階でコンタミネーションが起これば、以降の実験（ライブラリーの調整）が台無しになってしまう。そうならないように、DNA 抽出だけの専用の実験室（DNA 抽出室）を設けるべきである。また、DNA 抽出室は PCR 関連の部屋とは空間的に十分隔離しなければならない。さらに、組織からの抽出 DNA や PCR 産物を扱った当日は DNA 抽出室に入らないなどの細心の注意が必要となる。

DNA 抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

・遠心分離機（サリベットチューブが回せるもの）	
・遠心分離機（1.5mL チューブが回せるもの）	
・ヒートブロックまたは恒温器（56℃に設定）	
・サリベットチューブ	サンプル数分
・ピンセット	サンプル数分
・DNeasy Blood & Tissue Kit	サンプル数分
・Buffer AL および Proteinase K ¹	
・1.5mL エッペンドルフチューブ（低吸着）	サンプル数分
・エタノール（分子生物学用）	適宜
・TE バッファ（pH8.0: 分子生物学用）	適宜
・ゴム手袋（パウダーフリー）	
・マイクロピペット各種	
・フィルターチップ各種	
・1.5mL/2mL 用チューブラック	

¹ 本プロトコールでは、DNeasy キットに付属のバッファ-ATL は使用しない。

4-2-1. 実験の準備

実験中は必ずゴム手袋を着用する（これ以降の作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する）。

- 1) 56℃の恒温槽を準備する（温まるのに時間がかかるので、事前に準備しておく）。

- 2) 水サンプルを濾過したフィルターをサリベットに入れる (図 4-2-1-1、-2)。1 サンプルに 2 枚のフィルターを用いた場合は 2 枚まとめて一つのサリベットに入れる。
- 3) サリベットの上部および下部に、サンプル番号を振っておく (図 4-2-1-3)。

4-2-2. タンパク質の分解処理

- 1) サンプルあたり、400 μ L の Buffer AL、40 μ L の Proteinase-K (600mAU/ml) を添加する (4-2-2-1)。サンプルが n 個であればそれぞれ試薬を n + 1 倍まとめて調整してから分注すると良い。
- 2) 恒温槽で 56 $^{\circ}$ C、30 分間保温処理する (図 4-2-2-2)。恒温槽で加熱するとサリベットのキャップが飛ぶ場合があるため、バスケット部分と下のチューブの部分との間を少し緩め、立てて高温槽に入れる。
- 3) その後、3,000g で 3 分間遠心分離する (図 4-2-2-3)。この時点でサリベットの下部に濾液が 800~1,000 μ L となる (図 4-2-2-4)。
- 4) サリベット内のフィルターにまだ DNA が残っているのでこれをさらに回収するため、220 μ L の TE を添加後 (図 4-2-2-5)、1 分間静置する。その後、3,000g で 3 分間遠心分離する。実験中は必ずゴム手袋を着用する。

4-2-3. DNeasy カラムを用いた DNA の精製

- 1) フィルターの入ったサリベットの上部を外して捨て、下部の DNA 溶液 (図 4-2-3-1) に、400 μ L のエタノールを添加する (図 4-2-3-2)。
- 2) ピペティング (図 4-2-3-3) で混ぜてから DNeasy のカラム (図 4-2-3-4) へ 650 μ L 程度 (半分程度) 移し (図 4-2-3-5)、6,000g で 1 分間遠心する (図 4-2-3-6)。
- 3) 下の 2mL コレクションチューブにたまった濾液を捨て (図 4-2-3-7、-8)、サリベット下部に残っている DNA 溶液を再びカラムに移し (図 4-2-3-9)、6,000g で 1 分間遠心する。この作業を DNA 溶液がなくなるまで繰り返す。
- 4) カラムを新しい 2mL コレクションチューブに載せ替え (図 4-2-3-10)、500 μ L の Buffer AW1 を添加後 (図 4-2-3-11)、6,000g で 1 分間遠心する。
- 5) カラムを新しい 2mL チューブに載せ替え (図 4-2-3-12)、500 μ L の Buffer AW2 を添加後 (図 4-2-3-13)、使用している遠心分離機の最大遠心速度で 2 分間遠心する。

- 6) 遠心機から取り外すときや移動させるときなどは、ゆらして下部の液を上部のカラム部分の先に付着させることのないように注意する。
- 7) 低吸着の 1.5mL チューブを用意し、サンプル名等を記載する (図 4-2-3-14)。
- 8) カラムを低吸着の 1.5mL チューブに載せ替える (図 4-2-3-15, -16)。
- 9) 100~200 μ L の Buffer AE を添加し (図 4-2-3-17)、1 分間静置する。6,000g で 1 分間遠心分離後 (図 4-2-3-18)、カラムの出口部分が抽出溶液に付着しないように気をつけながらカラムを取り外し、1.5mL チューブの蓋をしっかりとしめる (図 4-2-3-19)。この状態で-20 $^{\circ}$ C で安定的に保存可能である。なお、回収 DNA 濃度が希薄となることが予想される場合には、溶出バッファー量を 50 μ L 程度まで減じることも可能である。その際は溶出バッファー量を記録しておくこと。

補足事項

サリベットを遠心できるサイズの遠心機がない場合は、サリベットの代わりに小型スピンのカラムを用いた抽出法を用いることもできる。詳細は Yamanaka et al. 2016 を参考にするとよい。

参考文献

- Uchii, K., Doi, H., & Minamoto, T. 2016. A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. *Molecular Ecology Resources* 16 (2): 415-422. Doi: 10.1111/1755-0998.12460
- Yamanaka, H., Motozawa, H., Tsuji, S., Miyazawa, R. C., Takahara, T., Minamoto, T. 2016. On-site filtration of water samples for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation. *Ecological Research* 31 (6): 963-967. Doi: 10.1007/s11284-016-1400-9

図 4-2-1-1

冷凍庫から取り出したフィルターをサリベットに移し替える。

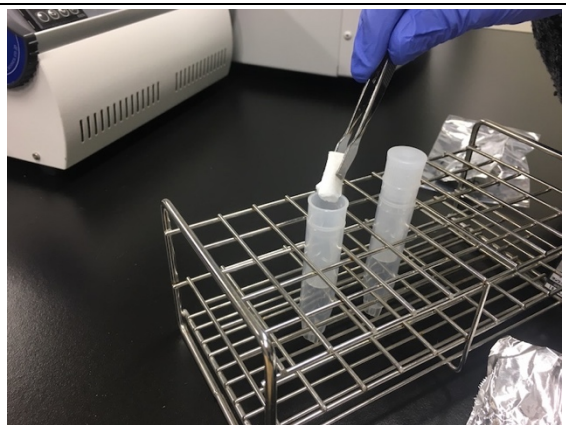


図 4-2-1-2

サリベットに入ったフィルター。



図 4-2-1-3

サリベットの上部と下部にサンプル番号を書く。



図 4-2-2-1

Buffer AL と Proteinase K の混合液を加える。

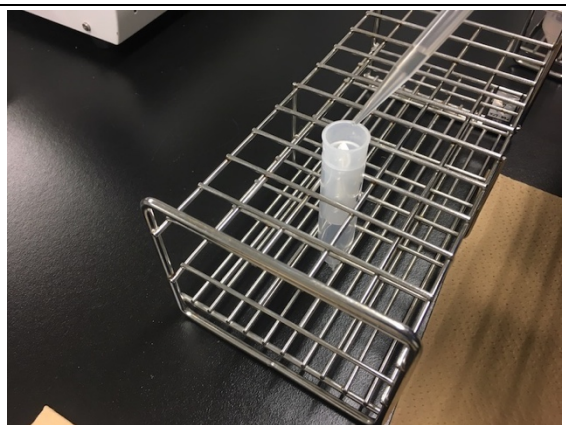


図 4-2-2-2

56℃で 30 分間保温する。



図 4-2-2-3

遠心機で遠心し、フィルター上の液体を
サリベット下部に落とす。

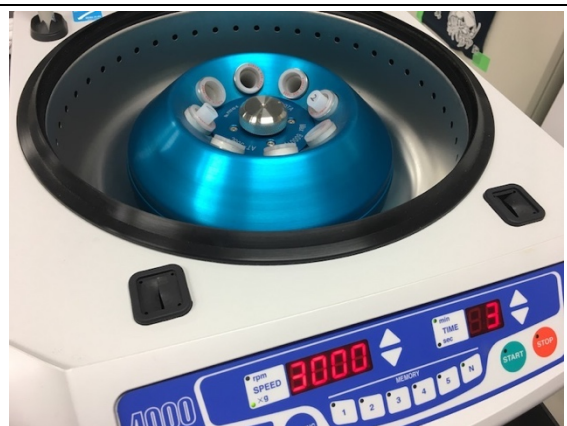


図 4-2-2-4

遠心後の様子。サリベット下部に液体が
800~1,000 μ L 程度回収される。

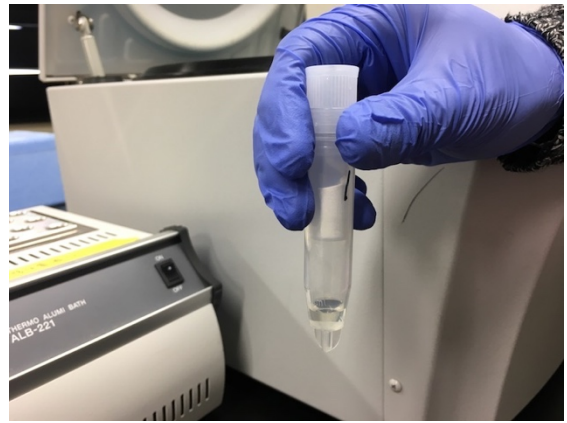


図 4-2-2-5

フィルターに TE バッファを加える。

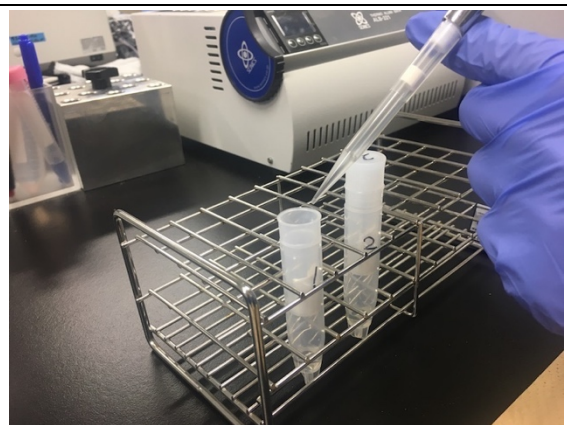


図 4-2-3-1

二度目の遠心後の様子。

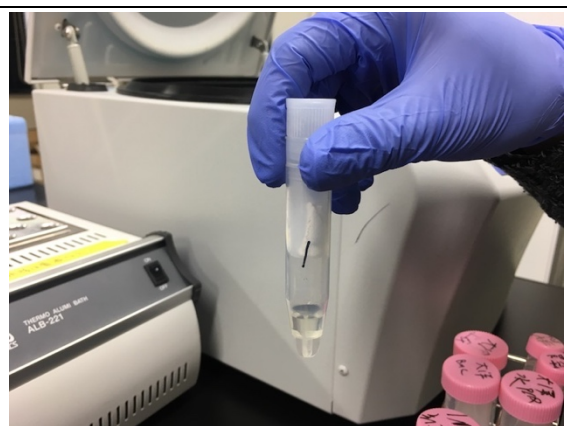


図 4-2-3-2

サリベット上部を取り外し、下部にエタノールを添加する。



図 4-2-3-3

エタノール添加後、ピペッティングでよく混ぜる。



図 4-2-3-4

DNeasy カラム。



図 4-2-3-5

サリベット下部の液を DNeasy カラムに移す。

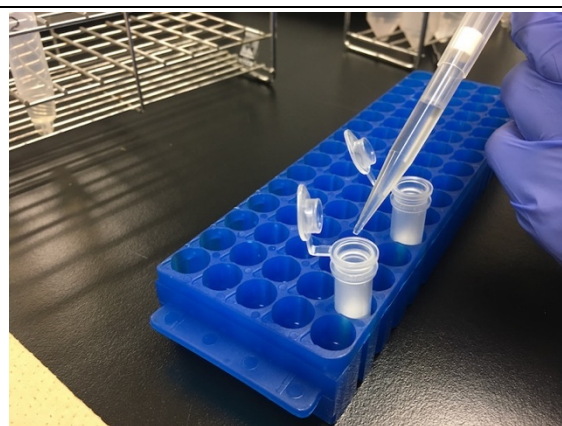


図 4-2-3-6

遠心で、カラムを通過させる。



図 4-2-3-7

DNA がカラム部分にトラップされるため、下部の液体は廃液である。

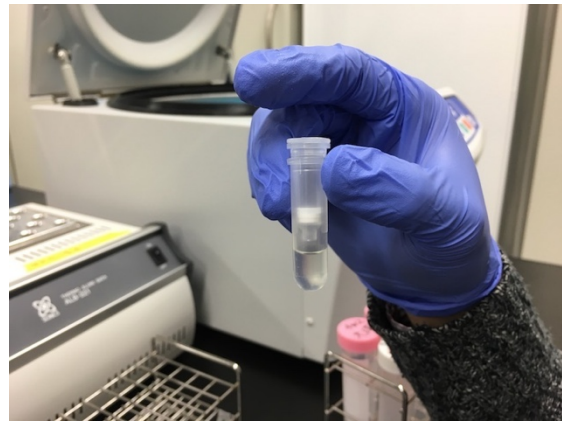


図 4-2-3-8

廃液を捨てる。

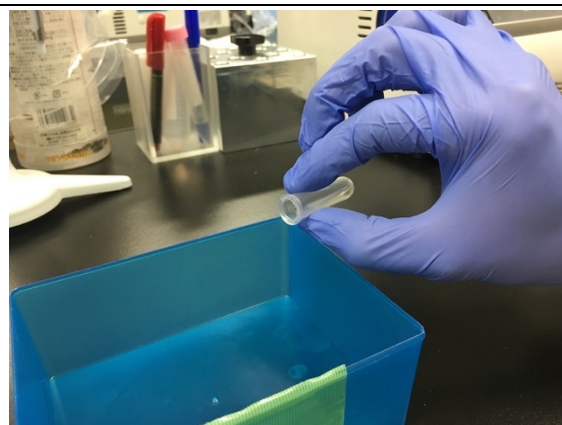


図 4-2-3-9

再びサリベットからカラムに DNA 溶液
を移し、遠心する。

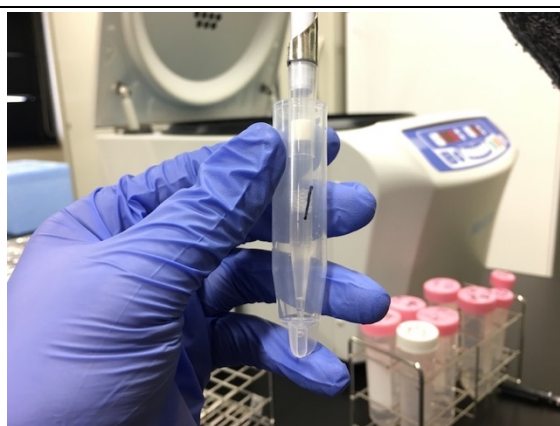


図 4-2-3-10

遠心後、カラムを新しい 2mL チューブ
に載せ替える。

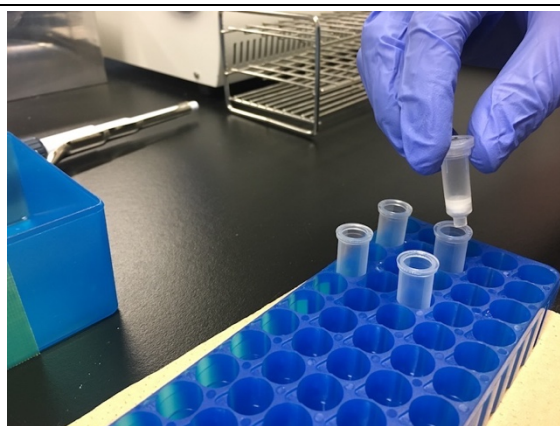


図 4-2-3-11

バッファー-AW1 を注ぐ。

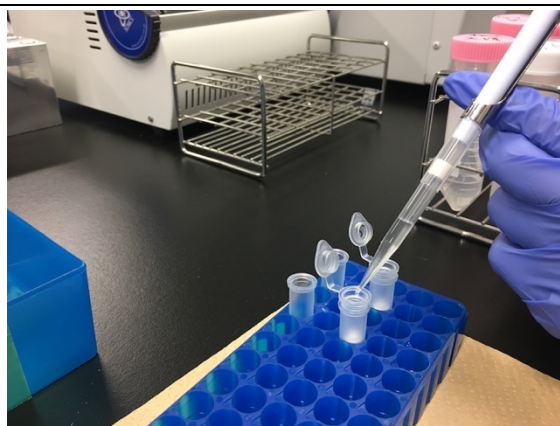


図 4-2-3-12

遠心後、カラムを新しい 2mL チューブ
に載せ替える。

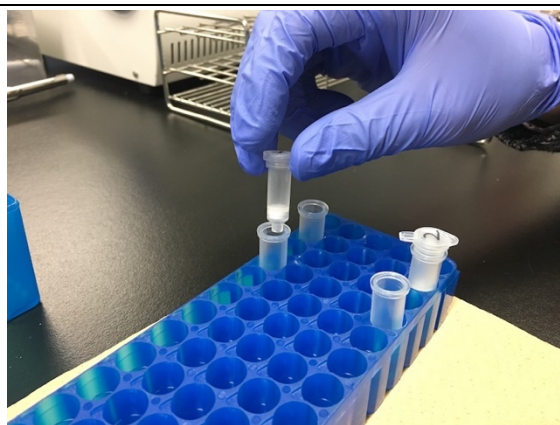


図 4-2-3-13

バッファーAW2 を注ぎ、遠心する。

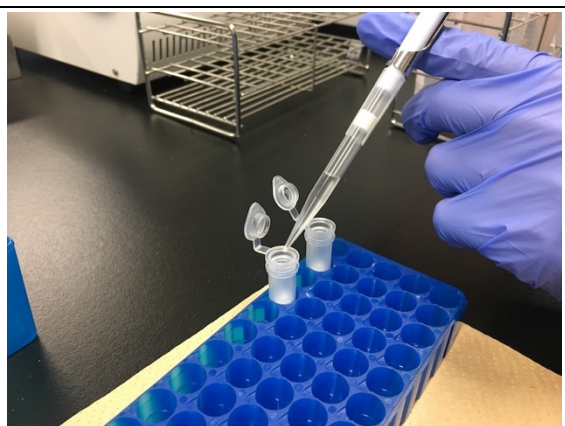


図 4-2-3-14

低吸着の 1.5mL チューブを用意し、サンプル番号を書く。

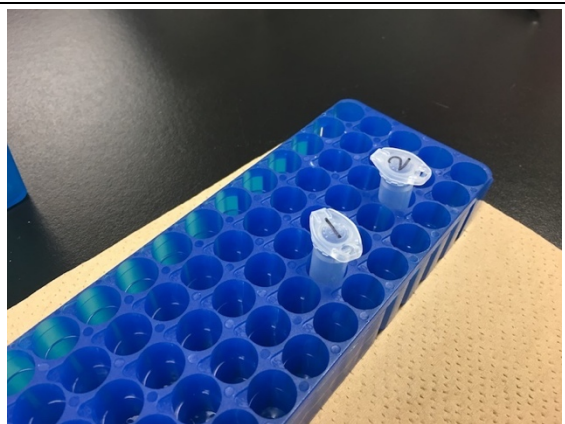


図 4-2-3-15

1.5mL チューブに遠心を終えたカラムを載せ替える。

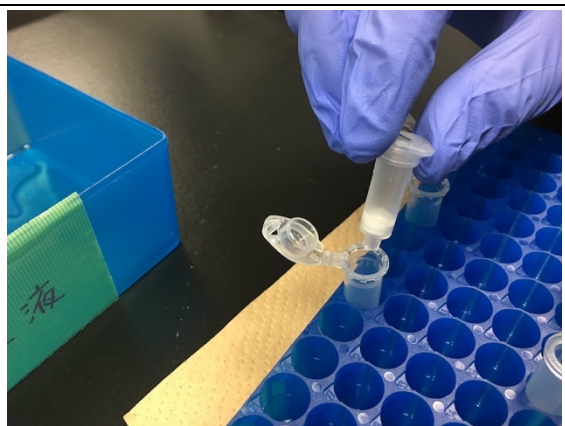


図 4-2-3-16

1.5mL チューブにカラムを載せ替えた状態。



図 4-2-3-17

バッファーAE を注ぎ、1 分静置の後、
遠心する。

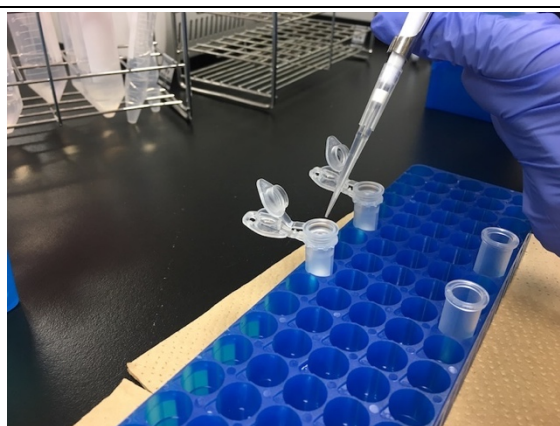


図 4-2-3-18

遠心後の状態。この時点では下部に落ち
た溶液が DNA サンプルであるので、捨
てないように注意する。

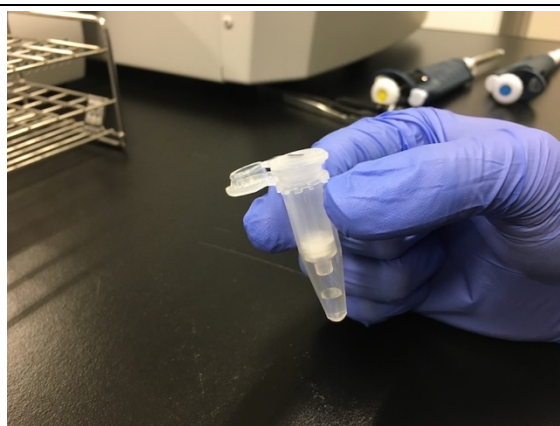
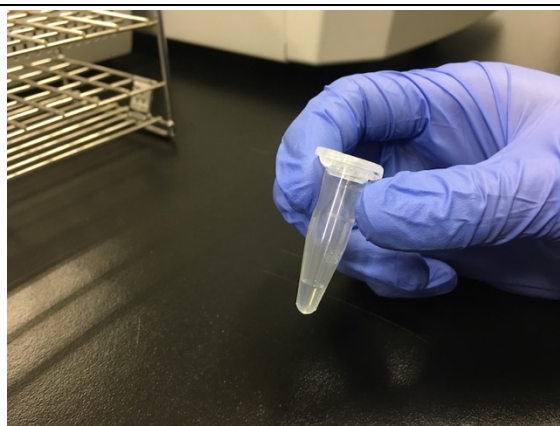


図 4-2-3-19

カラムを外し、蓋をしっかりと締め、冷
凍保存する。



5. DNA の分析

5-1. リアルタイム PCR による環境 DNA の種特異的な検出・定量

はじめに

本項では、リアルタイム PCR を用いた環境 DNA の種特異的な検出および DNA 量の定量について記す。種特異的な検出には対象種ごとに検出系を設計する必要があるため、ここで記すのは一例にすぎない。実験条件などについてはそれぞれの系について十分な検討が必要である。

5-1-1. 種特異的プライマー（およびプローブ）の設計

種特異的なプライマーに求められる条件は、対象種の DNA を効率よく増幅することと、同所的に生息する近縁種の DNA を誤増幅しないことである。そのためのプライマー設計の手順は以下のとおりである。

- 1) 塩基配列情報の入手：対象種および同所的近縁種の塩基配列情報をダウンロードする。NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) や BOLD (<http://www.barcodinglife.org>) 等のデータベースを適宜利用する。ただし、データベース上の情報には誤りが含まれていることに留意し、複数のシーケンス情報を元に検討することが望ましい。
- 2) プライマーの設計：対象種と近縁種の間に変異のある領域を探し、プライマーを設計する（図 5-1-1-2）。プライマーの 3' 末端付近に対象種に特異的な塩基があると良い。プライマーの設計に際しては T_m 値が適切な範囲にあるかなど、プライマー設計の一般的な注意点を参考にすると良い。必要に応じて TaqMan プローブも作成する。
- 3) In silico でのチェック：Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) などを用いて、プライマーの特異性を確認する。同所的に生息する他の生物種が増幅されないことの確認を行う。
- 4) In vitro でのチェック：対象種および近縁種の組織などから抽出した DNA サンプルを用いて PCR 実験を行い、DNA 増幅の有無をチェックして特異性を確認する（図 5-1-1-4）。
- 5) 環境 DNA のシーケンスチェック：環境サンプルに由来する DNA 増幅が確認された場

合には、PCR 増幅産物（アンプリコン）をシーケンスし、対象種の DNA が間違いなく増幅していることを確認する。

5-1-2. リアルタイム PCR 実験

以下は一例である。器材や試薬、対象種によってプロトコールの調整が必要である。

リアルタイム PCR 実験に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- ・リアルタイム PCR 装置（96 穴）
- ・PCR 試薬（2×Environmental Master Mix 2.0 : サーマフィッシャー）
- ・UNG 酵素（AmpErase Uracil N-Glycosylase : サーマフィッシャー）
- ・Assay Mix（各 18μM のプライマー、2.5μM の TaqMan プローブ^{*1}）
- ・96 穴 PCR プレートおよびシール
- ・ゴム手袋（パウダーフリー）
- ・マイクロピペット（各種）
- ・フィルターチップ（各種）

^{*1} 対象種毎にプライマーおよびプローブを設計する必要がある。

PCR1 反応あたりの試薬組成（例）

・ 2×Environmental Master Mix 2.0	10.0μL
・ AmpErase Uracil N-Glycosylase	0.1μL
・ Assay Mix	1.0μL
・ DNA	2.0~5.0μL
・ ミリ Q 水（超純水）	適量
・ 合計	20.0μL

全ての PCR 反応（ポジティブコントロール[定量スタンダード]、環境 DNA サンプル、フィールドブランク、濾過ブランク、PCR ブランクを含む）を 3 繰返し以上で行う。なお、定量を行う際には、定量スタンダードとして、人工合成遺伝子を用意し、4 段階以上の希釈系列を用いて定量する。

PCR 反応の条件は様々であるのでここでは一例として上記の試薬組成でプライマーの Tm 値が 60℃前後、2 ステップ PCR を行う場合について以下に記載する。

5 0℃で 2 分、95℃で 10 分の初期ステップの後、95℃で 15 秒、60℃で 1 分から

なるサイクルを 50-55 回程度繰り返す。

PCR プレートごとにポジティブコントロール（あるいは定量スタンダード）と PCR ブランク 3 繰り返しを載せるので、一度に解析できるサンプル（フィールドブランク、濾過ブランクを含む）数は 27（定量の場合）または 30 サンプル（在不在検出の場合）である。

3 繰り返しのうち、ひとつでもポジティブであったものを陽性と判断する（図 5-1-2）。定量測定の場合は定量スタンダードのデータを用いて DNA 量を測定する。陽性であったサンプルの少なくとも一部は PCR 増幅産物をシーケンスして確かに対象の DNA であることを確認する。特に、リアルタイム PCR 時の Cq 値（Ct 値）が大きいサンプルについてはシーケンスを確認することが望ましい。

PCR 阻害による陰性に対する対応

環境 DNA サンプルには腐植酸など PCR 阻害物質が含まれる事がある。ここで紹介した PCR の反応系は比較的 PCR 阻害の影響を受けにくいものであるが、時として PCR 阻害による偽陰性の結果が得られることがある。PCR 阻害による偽陰性が疑われる場合、インターナショナルポジティブコントロールとして増幅実績のある DNA をスパイクインするなどの方法で阻害の影響の有無を確認することができる。阻害が確認された場合には DNA 溶液を希釈して PCR を行うと結果が改善する場合がある。

参考文献

福岡有紗, 高原輝彦, 松本宗弘, 兵庫県立農業高校生物部, 丑丸敦史, 源利文 2016 在来希少種カワバタモロコシの環境 DNA による検出系の確立. 日本生態学会誌 66 (3): 613-620.

<p>図 5-1-1-2</p> <p>プライマーの設計。カワバタモロコいのプライマー設計の例。(福岡ら 2016 より)</p>	
<p>図 5-1-1-4</p> <p>In vitro の増幅チェック。対象種の DNA が増幅し (赤線)、近縁種の DNA が増幅しない (その他の色) ことを確認する。</p>	
<p>図 5-1-2</p> <p>リアルタイム PCR の結果の一例。</p>	

5-2. MiFish メタバーコーディング

5-2-1. ライブラリーの調整－1：1st PCR

実験を始める前に：コンタミのリスクを減らす方策

MiFish メタバーコーディングでは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いてターゲットとなる環境 DNA を分析可能な量に増幅すると同時に、PCR 産物の両端に各種のアダプターを付加することによって次世代シーケンサーで分析可能な分子に加工する（ライブラリーの調整）。一方、PCR は大量の DNA 断片を合成するため、実験の汚染源となりやすい。したがって、PCR の準備（試薬の調合等）を行う実験室（プレ PCR ルーム）と、PCR を行ったり PCR 産物そのものを扱う実験室（ポスト PCR ルーム）は空間的に隔離すべきである。また、PCR 産物を扱った当日には DNA 抽出やその他の実験を行わないなど、コンタミのリスクを減らす工夫も必要となる。さらには、MiFish メタバーコーディングでは二段階 PCR を行うため、最初の PCR（1st PCR）産物を希釈して二回目の PCR（2nd PCR）のテンプレートにする操作が必要となる。そのため、後者の実験室（ポスト PCR ルーム）には、この操作の際に生じるコンタミを防ぐためのクリーンベンチや、クリーンなオープンスペースをつくるテーブルコート（KOACH T 500, KOKEN）等を設置する必要がある。また、あらかじめマイクロピペット、チップ、チューブ、チューブラック、ミリ Q 水は殺菌灯式電気消毒器（NB-5, 日販工業株式会社など）を使って除染を行い（図 5-2-1-1）、実験机も泡ハイター等を使用して除染すべきである。

1st PCR に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- ・ サーマルサイクラー（GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems など）
- ・ 殺菌灯式電気消毒器（NB-5, 日販工業株式会社など）
- ・ KAPA HiFi HS ReadyMix（KK2602, KAPA Biosystems 社）¹
- ・ MiFish プライマー 原液（TE バッファーで 100μM に希釈済みのものを注文すると便利）

板鰓類用（サメ・エイ類に最適化したプライマー）

MiFish-E-F-v2 (5′-3′; 61 mer):
ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNRGTGGTAAATCTCGTGCCAGC
MiFish-E-R-v2 (5′-3′; 68 mer):
GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNGCATAGTGGGGTATCTAATCCTAG
TTTG

硬骨魚類用 ①（硬骨魚類全般に適用可能なユニバーサルプライマー）

MiFish-U-F (5′-3′; 60 mer):
ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNGTCGGTAAAACCTCGTGCCAGC
MiFish-U-R (5′-3′; 67 mer):
GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNNCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGT
TTG

硬骨魚類用 ② (温帯の沿岸域で一般的なアナハゼ類に最適化したプライマー)

MiFish-U2-F (5′-3′; 60 mer):
ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNGCCGGTAAAACCTCGTGCCAGC
MiFish-U2-R (5′-3′; 67 mer):
GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNNCATAGGAGGGTGTCTAATCCCCGT
TTG

- ・ ミリ Q 水 (または分子生物学実験用のハイグレードな滅菌水)³
- ・ TE バッファー (分子生物学実験用のハイグレードなもの)
- ・ 8 連チューブ
- ・ 1.5mL チューブ (DNA 低吸着)
- ・ マイクロピペット P-1000, P-200, P-100, P-20, P-2 (ピペットマン, ギルソン社など)
- ・ フィルターチップ (マイクロピペットの容量に合わせて各種)
- ・ 電動マイクロピペット 0.5~10μL, 5~100μL (Xplorer Plus, エッペンドルフ社など)
- ・ 1.5mL/2.0mL チューブ用チューブラック
- ・ 8 連チューブ用チューブラック
- ・ ゴム手袋 (パウダーフリー)

¹ 陸水のような PCR 阻害物質 (たとえば腐植酸) を含むことが多い環境水や泥試料から抽出した DNA では、KAPA HiFi HS で 1st PCR 産物が得られないことがある。このような場合、KOD FX Neo や KOD One (東洋紡) を用いることで良好な増幅が得られることがある。ただし、酵素によって非特異的増幅の起きやすさなどの特性が異なるので、使用の際には特性の違いを理解する必要がある。プロトコールについては、メーカーが提供するものをそのまま利用している。PCR 阻害物質の影響で増幅がうまくいかない場合には、サンプルを希釈するとうまく増幅する場合もあるが、その場合には 1st PCR 時の PCR サイクル数を増やすことも検討すると良い。ただし、40 サイクル以下とすること (5-2-1-1.参照)。

² アユ、ワカサギ、スナヤツメなど魚種によって、プライマー部分に変異があるために増幅効率が低下するものがある。これらの魚種が生息する環境で用いる場合、配列を修正したプライマーを少量混合すると検出可能である。

³ 実験室共用でミリ Q 水を使っているとコンタミの原因となりやすい。ミリ Q 水を使う場合は殺菌灯で実験のたびに除染するか、そうでない場合は分子生物学実験用の滅菌水を購入した方がよい。

1st PCR 産物の精製と濃縮に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- ・ 微量高速冷却遠心機（MX-307, TOMY など）
- ・ ボルテックス・ミキサー（VORTEX-GENIE 2, エムエス機器など）
- ・ 8 連チューブ用卓上遠心機（マイクロ PCR スピナー MS-PCR, アズワンなど）
- ・ 1.5mL/2.0mL 用卓上遠心機（マイクロシックス MS-1, アズワンなど）
- ・ GeneRead Size Selection Kit (180514, キアゲン)¹
- ・ 2.0mL コレクションチューブ (19201, キアゲン; キットの不足分を補うために別途購入)
- ・ 1.5mL チューブ (DNA 低吸着)
- ・ 80%エタノール (適量)
- ・ マイクロピペット P-1000, P-200, P-100, P-20, P-2 (ピペットマン, ギルソン社など)
- ・ フィルターチップ (マイクロピペットの容量に合わせて各種)
- ・ ゴム手袋 (パウダーフリー)

¹ DNA 精製試薬キット Agencourt AMPure XP や SPRIselect (両者共にベックマン・コールター社) 等のビーズで精製しても良好な結果が得られている。この場合、それぞれの試薬は PCR 産物と等量をもちいて、プロトコールはメーカーが提供するものをそのまま利用している。

精製・濃縮した 1st PCR 産物の定量に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- ・ TapeStation 2200 (アジレント・テクノロジー)¹
- ・ High Sensitivity D1000 Screen Tape (5067-5584, アジレント・テクノロジー)
- ・ High Sensitivity D1000 Reagents (5067-5585, アジレント・テクノロジー)
- ・ TapeStation 用ピペットチップ (5067-5153, アジレント・テクノロジー)
- ・ 卓上攪拌器 (ボルテックス MS3 ベーシック, イカジャパン)
- ・ 8 連チューブ用卓上遠心機 (マイクロ PCR スピナー MS-PCR, アズワンなど)
- ・ 1.5mL/2.0mL 用卓上遠心機 (マイクロシックス MS-1, アズワンなど)
- ・ 電動マイクロピペット 0.5~10 μ L (Xplorer plus, エッペンドルフ)
- ・ マイクロピペット P-2 (ピペットマン, ギルソンなど)
- ・ フィルターチップ 10 μ L
- ・ 8 連チューブ
- ・ 8 連チューブラック
- ・ ゴム手袋 (パウダーフリー)

- ・ ミリ Q 水 (超純水)

¹ 同社が販売するの BioAnalyzer でも良好な結果が得られている。この場合、プロトコールはメーカーが提供するものをそのまま利用している。

5-2-1-1. 1st PCR

環境水中から抽出した DNA をテンプレートに PCR を行う場合、抽出 DNA に含まれる魚類由来の DNA 量は事前にわかっていない。したがって、本番実験を行う前に予備実験を行うことで、PCR のサイクル数など至適な実験条件を探索することが重要になる。なお、実験中は必ずゴム手袋を着用すること（これ以降作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する）。

- 1) 実験を始める前にサーマルサイクラーの電源を入れる。
- 2) プライマーの希釈：市販の TE バッファーを用いて、プライマーの原液 (100 μ M) を 20 倍に希釈する。希釈済みプライマーを以下の比率で混合してプライマーミックスを作る。MiFish-E-F/R-v2 : MiFish-U-F/R : MiFish-U2-F/R=1:2:1 (淡水魚だけの場合は MiFish-U-F/R のみでよい)
- 3) 試薬の組成：全容量 12 μ L (DNA 量 2 μ L を含む) で PCR を行う場合に、チューブ 1 本あたりのプレミックスの組成は以下になる。(注意：試薬は必要量の 1.1~1.2 倍程度の量を調合しないと、電動ピペットで分注する際に不足することがある)。

KAPA HiFi HS ReadyMix	6.0 μ L
プライマーミックス	2.8 μ L
ミリ Q 水	1.2 μ L

- 4) PCR の繰り返し数：PCR での取りこぼし (PCR dropouts) を最小限に抑えるために、同一のサンプル (環境 DNA) に対して 8 連チューブ 1 本をつかった繰り返し数 8 回の PCR を行う。なお、1st PCR を実施する際に生じるコンタミネーションをモニターするために、1st PCR に必ず 1 本以上のブランクを入れること (繰り返し数は 1 回で抽出 DNA の代わりにミリ Q 水をテンプレートとして入れる)。濾過ブランクと抽出ブランクも同時に実験する場合でも、1st PCR の段階で必ず PCR ブランクは含める (図 5-2-1-1-1)。
- 5) 上記試薬を必要量の 1.1 倍程度調合してプレミックスを作成し、これを電動ピペットで 8 連チューブに 10 μ L ずつ分注する。その後、個々のチューブに抽出済みの環境 DNA を 2 μ L ずつ電動ピペットで分注する。PCR の繰り返し数が 8 回の場合、抽出 DNA を

2 μ L \times 8 = 16 μ L 使うことになる。

- 6) サーマルサイクラーの設定は以下ようになる：

最初に 95℃の DNA 変性を 3 分間を挿入
98℃の DNA 変性を 20 秒
65℃のアニーリングを 15 秒
72℃の伸長反応を 15 秒 } 35 サイクル
最後に 72℃の伸長反応を 5 分間を挿入

注意：アニーリング温度は KAPA HiFi Ready Mix の特性（少なくとも 60℃以上）によりかなり高めに設定してある。これより高いとプライマー配列とのマッチングが低い魚種が検出漏れとなり、逆にこれより低いと非特異的な産物（微生物の 16S rRNA 由来と推定される産物）が多くなる。両者のトレードオフを考えるとこのくらいのアニーリング温度が適正と思われるが、今後さらなる検討が必要である。

- 7) 1st PCR のサイクル数について：冬期のような魚の活性が低いときには 35 サイクルだと十分な増幅が見られないことがあるため調整が必要となる。そのような時は、40 回以下の範囲でサイクル数を増やすことで DNA の回収量を確保する。例えば房総半島沿岸では、冬期以外の暖かい時期では 35 サイクルで十分量の 1st PCR 産物（海水 1 L を濾過）が得られたが、水温が下がると同じ量の 1st PCR 産物を得るためには 38 サイクルが必要となった。また、PCR 産物が確認できないからといってサイクル数を 40 回より多くすると、ブランクにも明瞭な PCR 産物ができてしまうなど誤検出の原因となる。このようにサイクル数によってデータの質が変わりうるので、慎重に検討する必要がある。

5-2-1-2. 1st PCR 産物の精製と濃縮

本項ではスピнкаラム（GeneRead Size Selection Kit；以下「カラム」と記す：図 5-2-1-2-1）を用いた精製・濃縮法について記す。環境 DNA メタバーコーディングでは、事前に濃度が不明な微量の DNA を分析可能な量まで増幅させるため、それ以降の実験を阻害するプライマーダイマーやアダプターダイマーが残りやすい。これらを取り除くことが良質のライブラリーを作成するための必須条件となるため、以下のプロトコールでは同じ精製を 2 回繰り返している。1 回の精製でも十分な場合もあるが、精製を 2 回繰り返すことにより、ゲル上で検出できないレベルまでダイマー類を除去することができる。

- 1) 8 繰り返しした 1st PCR 産物を 1 本の 1.5mL チューブにまとめる（図 5-2-1-2-2）。8 連チューブ 1 本あたりの反応系が 12.0 μ L なので、すべて合わせると 96.0 μ L になる。ブランクについては 1 繰り返しのため 12.0 μ L のまま。

- 2) 各 1.5mL チューブに 4 倍量の SB1 溶液 (384 μ L ; ブランクの SB1 溶液量は 48 μ L) を入れ (図 5-2-1-2-3)、よく攪拌してから軽く遠心する。室温で 1 分間静置。
- 3) GeneRead Size Selection Kit に付属する専用のカラム (コレクションチューブ付き) を必要分用意し、キャップに必要事項を記入する (図 5-2-1-2-4)。
- 4) コレクションチューブにセットされたカラムに SB1 を混合した PCR 産物を入れ (図 5-2-1-2-5)、20,000g で 1 分間遠心する (図 5-2-1-2-6)。
- 5) 遠心後、コレクションチューブを外し、新しいコレクションチューブにカラムを載せ替える (図 5-2-1-2-7)。使用済みのコレクションチューブは廃棄する (図 5-2-1-2-8)。
- 6) カラムに 700 μ L の 80%エタノールを添加し (図 5-2-1-2-9) 20,000g で 1 分間遠心する (図 5-2-1-2-10)。終了後、カラムを新しいコレクションチューブに載せ替える。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。この操作 (80%エタノールによる精製) を 2 回繰り返す。
- 7) GeneRead Size Selection Kit に付属する 1.5mL のチューブを用意し、キャップに必要事項を記入する。カラムをその 1.5mL チューブに載せ替える (図 5-2-1-2-11)。
- 8) キットに付属の TE バッファー 90 μ L をカラムに注ぎ (図 5-2-1-2-12)、室温で 1 分間静置する。
- 9) カラムを 1 分間静置した後、20,000g で 1 分間遠心する。
- 10) 1.5mL のチューブに回収された産物 90 μ L に対して 2 回目の精製を行う。TE バッファーで溶出した抽出 DNA (90 μ L) の 4 倍量の SB1 溶液 (360 μ L) を 1.5mL チューブに入れ (図 5-2-1-2-13)、よく攪拌してから軽く遠心する。室温で 1 分間静置する。
- 11) カラムを新たなコレクションチューブに載せ、4 倍量の SB1 溶液を加えた 1 回目の精製済み産物をカラムに注ぐ (図 5-2-1-2-14)。20,000g で 1 分間遠心する。
- 12) 遠心後、コレクションチューブを外し、新しいコレクションチューブにカラムを載せ替える。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。
- 13) カラムに 700 μ L の 80%エタノールを加えて 20,000g で 1 分間遠心する。終了後、カラムを新しいコレクションチューブに載せ替える。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。この操作 (80%エタノールによる精製) を 2 回繰り返す。
- 14) DNA 低吸着の 1.5mL チューブ を用意し、必要事項をキャップに記入する。キャップを開けたままその上にカラムを装着する。

- 15) キットに付属する EB バッファー 17 μ L を、カラムのメンブレンの中心に注意深くピペットで注ぎ入れ (図 5-2-1-2-15)、室温で 1 分間静置。
- 16) 1 分間静置したカラムを 20,000g で 1 分間遠心。終了後、カラムを取り外してチューブのキャップをしっかりと閉じる (図 5-2-1-2-16)。カラムは廃棄する。この状態で -20 $^{\circ}$ C で安定的に保存が可能 (図 5-2-1-2-17)。

5-2-1-3. 精製・濃縮済み 1st PCR 産物の定量と希釈

精製によってプライマーダイマー等が除かれているかを確認すると同時に PCR 産物の量を測定する。ここでは、アジレント社の TapeStation 2200 を用いたプロトコールを記す。ちなみに、TapeStation 以外にも同社の BioAnalyzer、あるいは他社の同等の機器でも同様の分析が可能である。用いるキットは High Sensitivity D1000 ScreenTape System になる。ScreenTape には予めゲルが充填されており、一度に最大 16 本の 1st PCR 産物を定量できる。DNA ラダーを使用する場合は 15 本の産物が定量できる。

- 1) 30 分前に試薬を室温に戻しておく (図 5-2-1-3-1)。
- 2) TapeStation 2200 付属のコンピューターを起動する。起動完了後に TapeStation 2200 の本体の電源を入れる (図 5-2-1-3-2)。
- 3) TapeStation とコンピューターの接続が確認できたら、TapeStation 2200 コントローラーを起動し、ScreenTape と必要な数のチップをセットする (図 5-2-1-3-3)。
- 4) 8 連チューブを用意し、DNA ラダー (1 本) とサンプル数を合計した本数の High Sensitivity D1000 Sample Buffer 2 μ L を分注する (図 5-2-1-3-4)。
- 5) 分注した 2 μ L のバッファーに、ラダーもしくは精製濃縮済み 1st PCR 産物を 2 μ L ずつ入れ (図 5-2-1-3-5, 6) キャップをする。軽く遠心後、ボルテックスを使用し 2000rpm で 1 分間攪拌する (図 5-2-1-3-7)。攪拌後に再度軽く遠心し、溶液をチューブの底に集める。
- 6) 遠心後、溶液が飛び散らないように注意深くキャップを開け、TapeStation 2200 のカセットにセットする (図 5-2-1-3-8)。
- 7) TapeStation 2200 コントローラーの指示に従って (図 5-2-1-3-9, 10) 泳動を開始すると、20 分ほどでターゲットのバンド (約 310bp) がフェログラムと共に表示される (図 5-2-1-3-11)。
- 8) ターゲットバンドの濃度を読み取り、ミリ Q 水で 0.1ng/ μ L に希釈する。ブランクに

については、ポジティブサンプルの平均希釈率を便宜的に用いて希釈する。ただし、非特異的増幅が顕著である場合などは 2nd PCR 後に濃度を調整したほうが良い場合もある。その場合は 5-2-2-1 の 18) のステップでサンプルを 1 つのチューブにまとめずに、精製と DNA 濃度の測定を行う必要がある。

注意：精製・濃縮済み 1st PCR 産物の希釈にあたっては、PCR 準備室で個々のサンプルの希釈に必要なミリ Q 水を予め 1.5mL チューブに分注しておき、それを PCR 室に持ち込むとよい。精製・濃縮した 1st PCR 産物を PCR 準備室に持ち込むと、クロスコンタミの大きな原因となるので注意すること。また、希釈に必要なミリ Q 水の量を計算する際には、精製濃縮済み 1st PCR 産物の全量ではなくその一部（例えば 10.0 μ L）に対して行うと希釈の精度が上がる。こうすることで、2nd PCR 産物の量（リード数）がほぼ一定になる。また、所定の濃度に達しないときは、0.05ng/ μ L に希釈して 2nd PCR のサイクル数を増やすなど工夫する。

9) 希釈後の 1st PCR 産物と、残った希釈前の 1st PCR 産物は -20°C で保存する。

5-2-2. ライブラリーの調整—2 : 2nd PCR

実験を始める前に

本項では、定量済みの 1st PCR 産物をテンプレートに用いて 2nd PCR を行う方法について記す。2nd PCR は、シークエンスプライマーが付加したテンプレート（定量済み 1st PCR 産物）に、インデクス配列とフローセル結合配列を付加することが主な目的となる。テンプレートを増幅することが目的ではないので、サイクル数は通常 10 回にとどめているが、1st PCR 産物が十分量得られなかった場合（0.1ng/μL 未満にしか調整できない場合）は、濃度に応じて 2nd PCR のサイクル数を増やすなどの工夫が必要になる。また、ラン間のキャリーオーバー（MiSeq 内部の流路に残存する前回ランのライブラリー）の影響を最小限にするために、1 回使ったインデクス配列の組み合わせはその後の数回（2~3 回）のランでは使うべきではない。

2nd PCR に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- ・ サーマルサイクラー（GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems など）
- ・ 殺菌灯式電気消毒器（NB-5, 日販工業株式会社など）
- ・ 定量済み 1st PCR 産物（0.1ng/μL）
- ・ KAPA HiFi HS ReadyMix（KK2602, KAPA Biosystems 社）
- ・ インデクス付きプライマー原液（TE バッファーで 100μM に希釈されたものを注文すると便利；インデクス配列については本項末尾に関連情報を記す）

フォワードプライマーの一例（青の部分が 8 塩基からなるインデクス配列）

2nd PCR F D501 (5′-3′; 70 mer)
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC**TATAGCCT**TACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

リバースプライマーの一例（赤の部分が 8 塩基からなるインデクス配列）

2nd PCR R D701 (5′-3′; 66 mer)
CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CGAGTAAT**GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT

- ・ ミリ Q 水（または分子生物学実験用のハイグレードな滅菌水）
- ・ TE バッファー（分子生物学実験用のハイグレードなもの）
- ・ 8 連チューブ
- ・ 1.5mL チューブ（DNA 低吸着）
- ・ マイクロピペット P-1000, P-200, P-100, P-20, P-2（ピペットマン, ギルソン社など）

- フィルターチップ（マイクロピペットの容量に合わせて各種）
- 電動マイクロピペット 0.5~10 μ L, 5~100 μ L (Xplorer Plus, エッペンドルフ社)
- 1.5mL/2.0mL チューブ用チューブラック
- 8 連チューブ用チューブラック
- 実験用ゴム手袋（パウダーフリー）

2nd PCR 産物の切り出しに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- E-Gel iBase Power System (G6400, Invitrogen)
- E-Gel Safe Imager E-Gel Real-Time Transilluminator (G6500, Invitrogen)
- E-gel SizeSelect II 2% (G661012, Invitrogen)
- 分子サイズマーカー：50bp DNA Ladder (10416014, Invitrogen)
- 2nd PCR 産物（1 本あるいはライブラリーごとに複数本のチューブにまとめたもの）
- ミリ Q 水
- 1.5mL チューブ（DNA 低吸着）
- マイクロピペット P-100（ピペットマン, ギルソン社など）
- フィルターチップ 100 μ L
- 1.5mL/2.0mL チューブ用チューブラック
- ゴム手袋（パウダーフリー）

切り出した 2nd PCR 産物の定量に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies)
- Qubit dsDNA HS Assay (Q32851 [100 サンプル用], Life Technologies) (Q32854 [500 サンプル用], Life Technologies)
- Qubit 測定用 500 μ L 専用チューブ (Q32856, Life Technologies)
- 500 μ L チューブ用チューブラック
- 卓上小型遠心機（マイクロシックス MS-1, アズワン社など）
- マイクロピペット P-1000, P-200, P-100, P-20, P-2（ピペットマン, ギルソン社など）
- フィルターチップ（マイクロピペットの容量に合わせて各種）
- E-Gel で回収した 2nd PCR 産物
- ゴム手袋（パウダーフリー）

5-2-2-1. 2nd PCR

実験中は必ずゴム手袋を着用する（これ以降作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する）。事前にピペットやチューブ類は殺菌灯式電気消毒器で 20 分程度照射して除染しておく（図 5-2-1-1-1）。なお、以下に記す方法は、使用する試薬の量を減らすと同時に、2nd PCR で得られる各ライブラリーのリード数ができるだけ均一になるように工夫したものである。

注意：PCR の準備は必ず PCR 準備室（プレ PCR ルーム）で行うこと。また、希釈したとはいえテンプレートは PCR 産物を含む。したがって、テンプレートを PCR 準備室に持ち込むではない。テンプレートの分注は PCR 室（ポスト PCR ルーム）内のクリーンベンチ内（あるいはそれに相当するスペース）で行うこと。PCR 室でテンプレートを分注する際には、部屋のファンを停めて実験室内のチリが舞い上がらないように注意する。

- 1) 実験を始める前にサーマルサイクラーの電源を入れる。
- 2) プライマーの希釈：市販の TE バッファーを用いて、プライマーの原液を 5 μ M に希釈する。
- 3) 試薬の組成：全容量 15 μ L（DNA 量 1.86 μ L を含む）で PCR を行う場合に、チューブ 1 本当たりの組成は以下ようになる。（注意：試薬は必要量の 1.2 倍程度の量を調合しないと、電動ピペットで分注する際に不足することがある）。

KAPA HiFi HS ReadyMix	7.5 μ L
プライマー	各 0.88 μ L
ミリ Q 水	3.88 μ L
定量済み 1st PCR 産物	1.86 μ L

注意：2nd PCR では、フォワードプライマーとリバースプライマーに含まれるインデクス配列の組み合わせをサンプルごとに変える。こうすることによって、シーケンス後に異なるサンプルの識別が可能になる。インデクス配列の組み合わせ方にはいろいろな方法があるが、ここでは 8 連チューブをチューブラックに並べたときの「行」と「列」でインデクス配列を変える方法を採用する。8 連チューブの場合、行数は 8 に固定されている一方で、列数は使用する 8 連チューブの本数で調整できる。以下に、8 種のフォワードプライマー（インデクス配列は D501~508）と 4 種のリバースプライマー（インデクス配列は A701~704）を用いることで、32 ライブラリー（=サンプル）の並列シーケンスを可能にする組み合わせを示す。また、冒頭に記したように、ラン間のキャリーオーバー（MiSeq 内部の流路に残存する前回ランのライブラリー）の影響を最小限にするために、1 回使ったインデクス配列の組み合わせはその後の数回（2~3 回）のランに使うべきではない。

D501/A701	D501/A702	D501/A703	D501/A704
D502/A701	D502/A702	D502/A703	D502/A704
D503/A701	D503/A702	D503/A703	D503/A704
D504/A701	D504/A702	D504/A703	D504/A704
D505/A701	D505/A702	D505/A703	D505/A704
D506/A701	D506/A702	D506/A703	D506/A704
D507/A701	D507/A702	D507/A703	D507/A704
D508/A701	D508/A702	D508/A703	D508/A704

上記のような組み合わせの場合、行方向（横方向）には標記のフォワードプライマー（D501～508）を含むチューブ 4 本分のプレミックスを 8 種類、列方向（縦方向）には標記のリバースプライマー（A701～704）を含むチューブ 8 本分のプレミックスを 4 種類作成すればよい（図 5-2-2-1-2）。このように（プライマーのみを 1 本 1 本分注するのではなく）プライマーを含むプレミックスを作成することで、PCR 反応の総量が小さくても（ここでは 15 μ L）正確な反応溶液の調整が可能になる。

- 4) 全体に必要なプレミックス（KAPA+ミリ Q 水のみ）のプレミックスを必要量の 1.2 倍作成する。上記の 32 ライブラリーの場合であれば、 $KAPA\ 7.5\mu L \times 32 \times 1.2 = 288\mu L$ にミリ Q 水 $3.88\mu L \times 32 \times 1.2 = 149\mu L$ を加える（総量 437 μ L）。
- 5) フォワードプライマー 8 種 + リバースプライマー 4 種に用いる計 12 本の 1.5mL チューブを用意してキャップに必要事項を記入する。
- 6) 上記のフォワードプライマー 8 種のチューブに必要なプレミックス ($7.5\mu L + 3.88\mu L$) $\times 4 \times 1.12 / 2 = 25.5\mu L$ を 8 本のチューブに分注する（1.12 倍量）。
- 7) 上記のリバースプライマー 4 種のチューブに必要なプレミックス ($7.5\mu L + 3.88\mu L$) $\times 8 \times 1.12 / 2 = 51\mu L$ を 4 本のチューブに分注する（1.12 倍量）。
- 8) 6) の各チューブに必要な 8 種のフォワードプライマーを $0.88\mu L \times 4 \times 1.12 = 3.94\mu L$ ずつ分注する。
- 9) 7) の各チューブに必要な 4 種のリバースプライマーを $0.88\mu L \times 8 \times 1.12 = 7.88\mu L$ ずつ分注する。
- 10) 各フォワードプライマーを含むプレミックスを横方向に 6.57 μ L ずつ分注する。
- 11) 各リバースプライマーを含むプレミックスを縦方向に 6.57 μ L ずつ分注する。
- 12) 分注が終了した 8 連チューブのキャップを軽く閉じ、卓上小型遠心機で遠心して溶液をチューブの底に振り落とす。

- 13) 8 連チューブをチューブラックごと PCR 室のクリーンベンチ（あるいはそれに相当する空間）に持って行く。
- 14) 8 連チューブのキャップをプレミックスが飛散しないように注意深く開け、希釈済み 1st PCR 産物を所定のチューブに 1.86 μ L ずつ入れる。
- 15) 8 連チューブのキャップをしっかりと閉じ、卓上小型遠心機で溶液をチューブの底に落とす。
- 16) 2nd PCR では、アニーリングと伸長反応を合わせたシャトル PCR を行う。サーマルサイクラーを以下のように設定する。

最初に 95 $^{\circ}$ C の DNA 変性を 3 分間を挿入
 98 $^{\circ}$ C の DNA 変性を 20 秒
 72 $^{\circ}$ C のアニーリング+伸長反応を 15 秒 } 10 サイクル
 最後に 72 $^{\circ}$ C の伸長反応を 5 分間を挿入

- 17) 8 連チューブをサーマルサイクラーにセットし 2nd PCR を開始する。
- 18) 2nd PCR が終了すると、サンプルごとに固有のインデクスが付加されているので 1 本のチューブにまとめることができる。まとめて分析したいサンプル（たとえば 1 回の調査でとられた 10 サンプル）ごとに 1 本のチューブにまとめる（図 5-2-2-1-2）。1st PCR 後に希釈を行っている場合、特に濃度調整などは不要である。

5-2-2-2. 2nd PCR 産物の切り出し

2nd PCR 産物には、MiSeq を用いた超並列シークエンスに必要なフローセル結合配列（計 53bp）とインデクス配列（計 16bp）が 1st PCR 産物（約 300bp）の両端に付加されている。1st PCR 産物には、ターゲットとなる魚類由来の産物に加えて 70bp ほど大きな非特異的産物（微生物の 16S rRNA 由来の産物と推定されている）が含まれることが多い。本項では、魚類由来の 2nd PCR 産物（約 370bp）のみを E-Gel を用いたゲル泳動で切り出す方法（実際にはピペットで吸い出す方法）を記す。

- 1) 分子サイズマーカー（50bp DNA Ladder）原液 80 μ L にミリ Q 水 920 μ L を加えて希釈する。
- 2) E-Gel iBase Power System（以下 iBase）を E-Gel Safe Imager E-Gel Real-Time Transilluminator（以下 Safe Imager）の上へのせ、両者を付属のケーブルで接続してスイッチを ON にする。

- 3) E-gel SizeSelect II 2% (プラスチックケースに封入されたゲルで以下「ゲル」と呼ぶ) が入ったパッケージを開封し、ゲルのウェルに挿入されたコーム 2 個を注意深く取り外す (図 5-2-2-2-1)。
- 4) ゲルの右側から iBase に挿入する (図 5-2-2-2-2)。ゲルが正しく差し込まれると iBase のライトが点灯する。
- 5) 2nd PCR 産物と付属の Loading Buffer を混合し、上段の各ウェルに 20~25 μ L ローディングする。DNA マーカーをサンプルと別のウェルに 20~25 μ L ローディングする。未使用のウェルにはミリ Q 水を同じ分量ローディングする (図 5-2-2-2-3)。
- 6) 中段のウェル (回収用のウェル) の全てにミリ Q 水を満たす。回収ウェルにミリ Q 水を入れ忘れると、泳動が正常に進行しないので注意すること。
- 7) iBase に観察用プレートユニット (オレンジ色のフィルター付きユニット) をセットし (図 5-2-2-2-4)、モードボタンを何回か押して Run SizeSelect 2% (No. 9) モードにセットする。泳動時間はとりあえず 15 分にセットする。
- 8) 慣れないうちは、LED 照射ボタンを泳動中に押して産物の状態をチェックするとよい。本マニュアルで指定した分子サイズマーカーは 350bp が他のサイズより明るく光るので、約 370bp のターゲットバンドの良い目安となる。
- 9) 15 分が経過するとチャイムが鳴って泳動が一時停止する。LED 照射ボタンを押してターゲットバンドの位置を確認する。回収ウェルの直上に切り込まれたサイズマーカー (基準線) に達していなければ、さらに泳動を数分間追加する。
- 10) 基準線にターゲットバンドが達したら泳動を一時停止する。
- 11) 回収ウェルのミリ Q 水が泳動中に減少するので、減少した分を補充する。
- 12) 泳動を再開する。回収ウェルにバンド全体が入ったところで泳動を停止する。
- 13) ピペットを用いて回収ウェルからターゲットバンドを吸い出し、ライブラリーごとに 1.5mL チューブにまとめる (図 5-2-2-2-5)。回収する際に、ウェルの底にピペット先端で穴を開けないように注意する。

注意 : 多くの場合、一回の回収で十分量の 2nd PCR 産物を吸い出せるが、定量後に 4nM に調整するには濃度が不足することがある。そのような場合は、回収ウェルにミリ Q 水を満たして泳動を再開し、一旦バンドを回収ウェルの下流側に出し、泳動モードを Reverse E-Gel にして回収ウェルに戻して再び吸い出すという操作を繰り返すことも可能。この場合、カラムをつかって産物を濃縮すると十分な濃度の 2nd PCR 産物が得られる。

5-2-2-3. 切り出した 2nd PCR 産物の定量

本項では、E-Gel を用いて切り出したライブラリーの濃度測定法について記す。

- 1) Qubit dsDNA HS Assay キットを冷蔵庫から取り出し 30 分以上かけて室温に戻す (図 5-2-2-3-1)。
- 2) Qubit の濃度測定に必要なチューブの本数は校正用スタンダード #1 と #2 にライブラリーの数を加えたものになる。
- 3) キットが室温に戻ったら、Qubit Reagent を 1 μ L に Qubit Buffer を 199 μ L 加えた計 200 μ L のプレミックスを必要本数分調整する (図 5-2-2-3-2, 3)。濃度を測定するライブラリーが 1 本の場合、校正用スタンダード 2 本を含めて計 3 本が必要になるので、Qubit Reagent を 3 μ L に Qubit Buffer を 597 μ L 加えたプレミックスを調整する。
- 4) Qubit 測定用 500 μ L 専用チューブを 2 本取り出し、校正用スタンダード #1 と #2 用にプレミックスを 190 μ L ずつ分注する。その後、キットに付属するスタンダード #1 と #2 をそれぞれのチューブに 10 μ L ずつ入れ (図 5-2-2-3-4)、チューブのキャップを閉めてボルテックスで 2~3 秒攪拌し軽く遠心する。
- 5) 濃度を測定するライブラリーの数だけ 500 μ L チューブを用意し、それぞれにプレミックスを 198 μ L ずつ分注する。その後、ライブラリーを 2 μ L 入れ (図 5-2-2-3-5)、チューブのキャップを閉めてボルテックスで 2~3 秒攪拌し軽く遠心する。2 分間室温で静置する (図 5-2-2-3-6)。

注意 : 最低でも 2 分間室温で静置しないと測定値が安定しない。

- 6) Qubit 2.0 Fluorometer の画面をタッチして起動する。画面から DNA を選択し、次いで dsDNA High Sensitivity を選択する。校正用スタンダードを用いた校正をするかどうか聞いてくるので、4) で用意したスタンダード #1 と #2 を Qubit の指示に従って順番に測定する (図 5-2-2-3-8, 9)。
- 7) 次にライブラリーの濃度測定を行う。チューブをセットし、Calculate Stock Conc をタッチし、使用するサンプルの量を 2 μ L に設定して濃度を測定する。同じサンプルの濃度測定を、計測値が安定するまで複数回行うとよい。
- 8) Qubit ではテンプレートを 100 倍希釈した計測値 (ng/mL) が表示される (図 5-2-2-3-10)。この値が 10.0ng/mL 未満の場合には、複数ウェルから同一ライブラリー

を回収し、それをカラムで濃縮するなど工夫が必要になる。

5-2-2-4. インデクス関連情報

以下に示す表は、メタバーコーディングで広く使われているイルミナ社のインデクス配列（8塩基）である（A501~508/A701~712/D501~508/D701~712）。カスタムプライマーを注文する際には、i5の配列をフォワードプライマーに、i7の配列をリバースプライマーに、それぞれそのまま挿入する。以下の表では8塩基の配列が記載されている。MiSeqのランで用いるサンプルシートに記入する際には、i7の配列は逆相補鎖に変換して記入しないとならないので、以下の表でも逆相補鎖に変換して記載している。iSeq100など、機種によっては記入の仕方が異なるので注意が必要である。なお、これ以外のインデクスを使用したい場合は、Hamady et al. (2008) にリストアップされているインデクス配列から適当なものをピックアップすれば良い。手持ちのインデクス配列を増やすと、同時に分析できるライブラリーの数が増えると共に、ランごとにインデクスを変えることにより、ラン間のクロスコンタミ（MiSeq内部の流路に残存する前回ランのライブラリーに由来するコンタミ）を避けることもできる。また、異なる研究室間で相乗りシーケンスを行えるようになるため、研究経費の節約にもつながる。

Hamady, M., Walker, J. J., Harris, J. K., Gold, N. J., and Knight, R. (2008) Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nature Methods* 5: 235-237.

イルミナ社公認のインデクス配列に関する最新の情報については、以下のサイトから入手することができる（2018年6月現在）。

https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/experiment-design/illumina-adapter-sequences-1000000002694-06.pdf

Name	i5 bases	Name	i7 bases	Name	i5 bases	Name	i7 bases
A501	TGAACCTT	A701	ATCACGAC	D501	TATAGCCT	D701	ATTACTCG
A502	TGCTAAGT	A702	ACAGTGGT	D502	ATAGAGGC	D702	TCCGGAGA
A503	TGTTCTCT	A703	CAGATCCA	D503	CCTATCCT	D703	CGCTCATT
A504	TAAGACAC	A704	ACAAACGG	D504	GGCTCTGA	D704	GAGATTCC
A505	CTAATCGA	A705	ACCCAGCA	D505	AGGCGAAG	D705	ATTCAGAA
A506	CTAGAACA	A706	AACCCCTC	D506	TAATCTTA	D706	GAATTCGT
A507	TAAGTTCC	A707	CCCAACCT	D507	CAGGACGT	D707	CTGAAGCT
A508	TAGACCTA	A708	CACCACAC	D508	GTACTGAC	D708	TAATGCGC
		A709	GAAACCCA			D709	CGGCTATG
		A710	TGTGACCA			D710	TCCGCGAA
		A711	AGGGTCAA			D711	TCTCGCGC
		A712	AGGAGTGG			D712	AGCGATAG

5-2-3. MiSeq を用いた超並列シーケンス

シーケンスを始める前に

本項では、イルミナ社の MiSeq を用いた超並列シーケンス法について記す。本手法によるシーケンスを成功に導く最も重要な点は、アダプターダイマーや非特異的産物を含まない、MiFish アンプリコンのみからなる良質のライブラリーを調整することである。このような良質のライブラリーを得ると同時に、ライブラリーごとにほぼ均等なリード数を得るため、本プロトコルでは 1st PCR 産物に対して精製・定量を行い、1st PCR 産物を一定濃度 (0.1ng/μL) に調整したテンプレートを用いて 2nd PCR を行うプロトコルを採用した。また、ランを失敗しないためにも MiSeq のメンテナンスが非常に重要になるので、最初にメンテナンスに関連する情報を列記した。なお、MiSeq の他にイルミナ社の iSeq100 でもほぼ同様の解析が可能であることが確認されている。

MiSeq のメンテナンスに必要な試薬・消耗品 (例)

- Tween 20 (P7949、Sigma-Aldrich)
- ミリ Q 水
- 50mL 自立式遠沈管
- 500mL 洗浄瓶
- 0.01%次亜塩素酸溶液
- 次亜塩素酸溶液用専用チューブ (MiSeq Disposable Wash Tubes: PN: MS-102-9999)
- ゴム手袋 (パウダーフリー)

シーケンスに必要な実験器具と試薬・消耗品 (例)

- MiSeq (イルミナ社)
- MiSeq Reagent Kit v2 (300 サイクル) (MS-102-2002, イルミナ社) : 総リード数 1500 万本が必要な場合は本品を用いる。それより少なくてよい場合は MiSeq Reagent Micro Kit v2 (MS-103-1002 ; 総リード数約 400 万本) か MiSeq Reagent Nano Kit v2 (MS-103-1001 ; 総リード数約 100 万本) を用いる。
- 濃度測定済みのライブラリー
- 0.2N NaOH (2N などの濃度の高いストックから実験のたびに調整する)
- PhiX Control v3 (FC-110-3001, イルミナ社)
- 99.5% 分子生物学用グレードエタノール (和光純薬工業)

- ・ ミリQ水
- ・ 脱イオン水
- ・ 1.5mL チューブ (DNA 低吸着)
- ・ ボルテックス・ミキサー (VORTEX-GENIE 2 Mixer, エムエス機器株式会社) と 3 インチプラットホーム
- ・ マイクロピペット P-1000, P-200, P-100, P-20, P-2 (ピペットマン, ギルソン社など)
- ・ フィルターチップ (マイクロピペットの容量に合わせて各種)
- ・ チップ 1000 μ L
- ・ レンズクリーニングティッシュ (2105-841, ワットマン)
- ・ 卓上小型遠心機 (マイクロシックス MS-1, アズワン社など)
- ・ マイクロピペット P-1000, P-200, P-100, P-20, P-2 (ピペットマン, ギルソン社など)
- ・ 試薬キット解凍用バット (W373×D273×H63 程度の大きさ) (PB-2,アズワンなど)
- ・ ゴム手袋 (パウダーフリー)

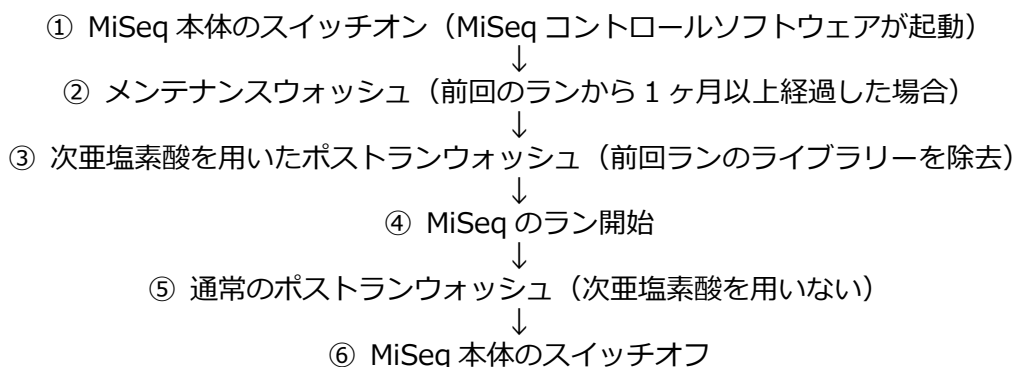
MiSeq Reagent Kit には、**冷凍保存品**として 1) HT1 チューブと 2) 試薬カートリッジ (図 5-2-3-A) が、**冷蔵保存品**として 3) PR2 ボトルと 4) フローセル (図 5-2-3-B) の 4 点が含まれる。ごくまれに、業者の勘違いですべてが冷凍状態で納品されることがあるが、PR2 ボトルとフローセルは凍結すると劣化するので、そのようなキットの使用は避けるべきである。

5-2-3-1. MiSeq のメンテナンス

MiSeq 内部には、シーケンス反応が行われるフローセルにライブラリーや試薬を送るチューブが縦横に張り巡らされている。これらチューブの流路を、前回ランの影響が残らないようにきれいに保つことがランを成功に導く大きな要因の一つになる。

MiSeq では次の 3 通りの洗浄を行う。1) メンテナンスウォッシュ：2 回のウォッシュ液交換を伴う 3 × 20 分のウォッシュで月に 1 回必ず行う (前回のランから 1 ヶ月以上経過すると、MiSeq 側から強制的にメンテナンスウォッシュを行うように要求される) ; 2) スタンバイウォッシュ：1 回のウォッシュ液交換を伴う 2 × 50 分のウォッシュで、1 週間以上 MiSeq をアイドル状態にすると MiSeq 側からこのウォッシュを行うように要求される ; 3) ポストランウォッシュ：ウォッシュ液交換のない 1 × 20 分のウォッシュでラン終了後に行う。なお、ポストランウォッシュには、イルミナが提供するアダプターを用いた次亜塩素酸ウォッシュというプロトコルがあるので、通常はこちらを用いて前回ランの持ち越しライブラリーを流路から取り除くようにする。ラン終了後、ポストランウォッシュ

を行いスイッチオフにした場合、以下のような流れで一連のウォッシュを行い、次のランに進むことになる。なお、前回ウォッシュを行なった日付はウォッシュのトップ画面に日付が表示されるので、それを参考にする。



すべてのウォッシュに共通する操作

- 1) 10% Tween 20 ウォッシュ液の作成 : Tween 20 原液 (図 5-2-3-1-1) を希釈して 10%の Tween 20 溶液 (ストック可能) をつくり、さらにそれを希釈して実際に用いる 0.5% Tween 20 ウォッシュ液とする。なお、10%に調整済みの Tween 20 を購入して使ってもよい。ゴム手袋を着用し、50mL 遠沈管に 5mL の Tween 20 を注意深く注ぐ (Tween 20 は非常に粘性が高いので入れ過ぎないように注意 ; 図 5-2-3-1-2)。この遠沈管にミリ Q 水を加えて 50mL にメスアップ。遠沈管をよく攪拌して溶液を混和する。1 回のウォッシュで 10%の Tween 20 溶液を 25mL 使用するので、これが 2 回分のウォッシュ液になる。
- 2) 0.5% Tween 20 ウォッシュ液の作成 : 上記の 10%の Tween 20 溶液 25mL を 500mL の洗浄瓶に入れ (図 5-2-3-1-3)、洗浄びんの目盛りで 500mL に達するまでミリ Q 水を加える。10 回ほど転倒混和する。
- 3) ウォッシュ液の充填 : 溶液の入った洗浄瓶を使ってウォッシュカートリッジにウォッシュ液を注入する (図 5-2-3-1-4)。ウォッシュカートリッジのポート (孔) の上から 1cm 程度までウォッシュ液を注ぐと約 6mL 入る。すべて注ぎ終わったら残りのウォッシュ液をウォッシュボトル (350mL 程度) に移し替える (図 5-2-3-1-5)。
- 4) ウォッシュの準備 : MiSeq コントロールソフトウェア (MCS) のトップ画面 (図 5-2-3-1-6) の左下にある Perform Wash ボタンを押すと 3 通りのウォッシュが表示される (図 5-2-3-1-7)。実施したいウォッシュを選択する。使用済みフローセル (前回のランで使用したフローセル) がフローセルコンパートメントにセットされていることを確認する (図 5-2-3-1-8)。画面右下の Next を押すと、ウォッシュカートリッジとウ

ウォッシュボトル、廃液ボトルの取り出し画面に変わる。

- 5) ウォッシュカートリッジのセット：しばらくすると、カートリッジやボトルが取り出される様子が画面に現れる（図 5-2-3-1-9）。MiSeq 本体の試薬コンパートメントのドアを開け、次に試薬チラーのドアを開ける。試薬チラー内に入っている前回ランのカートリッジ、もしくは前回ウォッシュに用いたウォッシュカートリッジを引き出し、用意したウォッシュカートリッジを奥まできっちり入れ（図 5-2-3-1-10）、試薬チラーのドアを閉める。
- 6) ウォッシュボトルと廃液ボトルのセット：次に試薬コンパートメントのシッパーハンドルを引き上げる。用意したウォッシュボトルをセットし（図 5-2-3-1-11）、廃液ボトルを空にして所定の位置にセットしたら、シッパーハンドルを引き下げる（図 5-2-3-1-12）。
- 7) ウォッシュの開始：ウォッシュカートリッジ、ウォッシュボトル、廃液ボトルのセットが完了したら、MiSeq の試薬コンパートメントの扉を閉じ、画面右下の Next を押すとウォッシュが始まる（図 5-2-3-1-13）。
- 8) ポストランウォッシュの終了：ウォッシュが終了すると右下に Done と表示されるので、それを押すと MiSeq コントロールソフトウェアのトップ画面に戻ってウォッシュの全工程が終了する。メンテナンスウォッシュとスタンバイウォッシュの場合は、以下に記すようにウォッシュ液の交換が必要となる。したがって、ウォッシュ中に先ほど使用した洗浄瓶を水道水でよく洗いミリ Q ですすいだ後、再度 0.5% Tween 20 ウォッシュ液を用意する。
- 9) ウォッシュ液の交換：メンテナンスウォッシュかスタンバイウォッシュの場合、最初のウォッシュが終了するとウォッシュ液を交換するメッセージが表示される。MiSeq の試薬コンパートメントにあるウォッシュカートリッジとウォッシュボトルを取り出し、両者の中に残っている溶液を廃棄する。カートリッジのポートとボトル内部を水道水でよく洗った後にミリ Q 水でよくすすぐ。新たに作成した 0.5% Tween 20 ウォッシュ液を前述と同様にポートとボトルに満たし、再度 MiSeq の試薬コンパートメントにセットする。廃液はそれほど溜まらないので、廃液ボトルはそのまま使用してもよい。
- 10) ウォッシュの終了：メンテナンスウォッシュかスタンバイウォッシュの場合、全ての工程が終わると右下に Done と表示される（図 5-2-3-1-14）。Done を押すと MiSeq コントロールソフトウェアのトップ画面に戻ってウォッシュの全工程が終了する。

次亜塩素酸を用いたウォッシュ

- 1) ウォッシュの準備：ウォッシュカートリッジを用意し、17 番ポートに次亜塩素酸溶液

用専用チューブ（図 5-2-3-1-15 ; MS-102-9999 MiSeq Disposable Wash Tubes）を入れ（図 5-2-3-1-16）、その中に 0.01%に調整した次亜塩素酸溶液を 1mL 注ぐ。17 番ポート以外は通常のポスランウォッシュと同様に 0.5% Tween 20 ウォッシュ液入れ、残りをウォッシュボトルに入れる。

- 2) 準備が終わったらトップ画面の左下にある Perform Wash ボタンを押す。3 通りのウォッシュが表示されるので Post-Run wash を選択する。画面が切り替わると次亜塩素酸溶液を使用・不使用のチェックボックスが中央やや下に現れるのでチェックを入れる。
- 3) 右下の Next を押す。これ以降は、前述のウォッシュの実施と同じ。ウォッシュが終了すると右下に Done と表記されるので、それを押すと MiSeq コントロールソフトウェアのトップ画面に戻る。

ラン終了後のポスランウォッシュ

ランが終了すると、右下に Start Wash と表示されるので押す。以降は前述のウォッシュの実施と同じ。

MiSeq 本体の起動法

MiSeq 本体の右側の後ろにあるスイッチを入れる。本体付属の OS である Windows が起動し、起動が完了すると自動的に MiSeq コントロールソフトウェア（MCS）が起動する設定になっている（図 5-2-3-1-17）。起動が完了するには 5 分程度必要になるので、ラン開始の時間を見計らって MiSeq 本体を起動すること。なお、ランの途中停止などのトラブルを避けるために、ランを開始するたびに MiSeq 本体を再起動することを勧める。

5-2-3-2. シークエンスの下準備

本項では、シーケンスを実際に開始する遅くとも 1 時間前までに終わるべき操作について記す。他の実験（とくに PCR）とは異なりこの段階でのコンタミの恐れは低いが、実験中は必ずゴム手袋を着用して事前にピペットやチューブ類は殺菌灯式電気消毒器で 20 分程度照射し除染しておく。

- 1) 冷凍品の解凍：バットを用意し、冷凍保存してある試薬カートリッジと HT1 バッファアのチューブを入れ、カートリッジの側面にある最大水量線まで脱イオン水を静かに注ぐ（図 5-2-3-2-1）。そのまま約 1 時間脱イオン水に漬けたまま静置し、キット内部の試薬を十分に解凍する。

- 2) 0.2N NaOH 溶液の準備 : 0.2N NaOH 溶液は、ライブラリーの DNA を一本鎖に変性させるために用いる。毎ランごとに 2N NaOH 溶液 (ストック可) からミリ Q 水を用いて希釈し、新鮮な 0.2N NaOH 溶液を調整することが重要。使用する量は微量なので、1.5mL チューブに 1mL 調整すれば、希釈時の誤差も小さく十分量が得られる。調整した 0.2N NaOH 溶液は使用するまで冷蔵庫に保存する。
- 3) サンプルシートの作成 : MiSeq 本体に搭載されているソフトウェア Illumina Experiment Manager (以下 IEM) を起動し、画面の指示に従ってサンプルシートを作成する。サンプルシート作成に必要な試薬カートリッジの番号 (例 : MS-XXXXXXX-300V2.csv ; 図 5-2-3-2-2) がカートリッジ側面に記してあるので記録しておく。なお、保存形式が CSV 形式になっていれば、サンプルシートはエクセル等のスプレッドシートで編集可能。したがって、ベースとなるファイルを IEM で作成し、それを別途スプレッドシートで編集し直すのが効率的。作成したサンプルシートは、MiSeq 本体の Illumina/Illumina Control Software フォルダー内に保存する。

5-2-3-3. ライブラリー濃度の最終調整

本項では、シーケンス反応が行われるフローセル上において適正な密度でクラスターが形成され、同時にクラスター間の分離がよくなるような実験手法について記す。なお、以下の操作を行うことで得られることが期待されるリード数はキット記載の総リード数からスパイクインした PhiX の割合を除いた数である。

- 1) 4nM への調整 : Qubit で定量した濃度に基づきライブラリーを 4nM に調整する。モル数の計算に用いるのはライブラリー長 (平均 372bp) と 1 塩基あたりの分子量 (660g/mol) になるが、複数の単位 (micro/nano/pico) にまたがって濃度を計算しなくてはならないので、予めスプレッドシートにモル数換算式を入れておくと良い。また、サンプル数が異なる複数のライブラリーを一度にシーケンスする場合は、サンプル数 (ブランクを除いたもの) から混合比を算出し、それぞれの混合量を決定する。2nd PCR 産物をサイズセレクションしたライブラリは平均 372bp のライブラリー長となる。その溶液の重量濃度が α ng/ μ L の時、モル濃度は $\alpha * 10^6 / 372 * 660$ の計算式で求めることができる。
- 2) DNA の変性 : 新しい 1.5mL チューブに、4nM に調整したライブラリーを 5 μ L と 0.2N NaOH を 5 μ L 入れてピペットで混合する。その後、数秒間ボルテックスし、軽く遠心して溶液をチューブの底に集め、室温で 5 分間静置してライブラリー中の DNA を変性する。この時点での濃度は 2nM。
- 5) 20pM への調整 : 変性した DNA に HT1 バッファーを 990 μ L 加え、20pM に調整する

(100 倍希釈)。

- 6) 最終濃度 (12pM) への調整 : MiFish アンプリコンの場合、最終濃度を 12pM に調整すると 800~1000K/mm² のクラスター密度が得られ、メーカーのスペックにほぼ一致するリード数が得られる。最終濃度を 12pM にするには、ライブラリーを 360μL に HT1 バッファーを 240μL 加えればよい。ライブラリーが低品質の場合 (本来の長さである 370bp 付近よりも短い DNA が混ざっている場合)、最終濃度を 12pM に調整するとオーバークラスターとなりランを失敗するので注意すること。
- 7) PhiX のスパイクイン : フローセル上に形成されるクラスター同士のシグナル分離をよくするため、塩基バランスが良い PhiX をスパイクインとして 10-25%入れる。イルミナ社から販売されている PhiX control v3 は 10nM に調整済みのバクテリオファージに由来する既知配列に基づくライブラリーである。これをサンプル DNA と同様に 0.2N NaOH で変性し、HT1 バッファーで 20pM に調整する。その後、上記の 600μL のライブラリーから 60μL を抜き取り、20pM に調整した PhiX を 36μL、HT1 バッファーを 24μL 加える。

以上の操作で、12pM に調整されたライブラリー600μL ができた。後は、調整済みライブラリーを試薬カートリッジに注入し、ランを開始するにあたっての最終操作を行えばよい。

5-2-3-4. シークエンス開始前後の操作

本項では、シークエンス開始前後に必要な操作について記す。既にライブラリーは 12pM に調整されており、機器を正しく設定すればシークエンスできる段階になっている。

- 1) 試薬カートリッジ内の試薬が完全に解凍されたことを確認し、キムタオルでカートリッジ外側についた水滴を十分に拭き取る。試薬カートリッジを 10 回程度転倒攪拌し、カートリッジ内の試薬を混和する。試薬内の気泡を取り除くため、キムタオルを敷いた実験台の上にカートリッジを何回か軽く叩きつける (図 5-2-3-4-1)。
- 2) 1000μL のピペットチップをつかってライブラリー注入ポート (オレンジ色が目印) のホイルに孔を開ける。
- 3) 1200μL または 1000μL のピペットチップをつかって 12pM に調整されたライブラリー600μL を試薬カートリッジの注入ポートに入れる (図 5-2-3-4-3)。気泡が入らないようにピペット操作には注意すること。
- 4) MiSeq コントロールソフトウェア (MCS) を起動し SEQUENCE ボタンを押してランのセットアップに進む。

- 5) MiSeq をインターネットに接続していると、SEQUENCE ボタンを押した後に BaseSpace (イルミナ社が提供するクラウド環境) を使用するかどうかの確認ボタンが表示される (図 5-2-3-4-4)。BaseSpace の利用にあたっては、事前に Myillumina へのユーザー登録が必要となる。
- 6) BaseSpace を使用する場合には、Use BaseSpace for storage and analysis のボックスにチェックを入れ、表示欄に Myillumina アカウント登録時に使用した情報を入力する。BaseSpace を使用しない場合はこのボックスを空欄にしておけばよい。選択が終わったら、Next ボタンを押すとフローセルのセッティング画面に切り替わる。
- 7) 冷蔵保存されていたフローセルをプラスチック製ピンセットを使って容器から取り出す。フローセルは容器内でバッファーに浸かった状態で保存されており、MiSeq にセットする前にそのバッファーを完全に洗い流す必要がある。この洗浄が十分でないと、残存したバッファーがシーケンス中にフローセル上に析出し、データが読み取れなくなる恐れがある。洗浄にあたってはゴム手袋を着用し、MiSeq にセットする前にフローセルのガラス部分とプラスチック部分をミリ Q 水でよくリンスする。とくに、フローセルのプラスチックケース内にバッファーが残りやすいので、その部分はよくリンスすると共にケース内の水分を (注意深く) 軽く振り出す。この際、ガスケット (試薬やサンプルへの流路の入り口) 部分に強く水流が当たらないように注意する。
- 8) レンズクリーニングティッシュに 99.5%エタノールを少量滴下し、フローセルのガラス部分についた水分を軽く拭き取る。ガラス部分に汚れや染みがないか目で確認し、きれいになるまでレンズクリーニングティッシュで軽く磨く。フローセルのプラスチック部分にある 2 穴のガスケットポートには触れないように注意すること。
- 9) MiSeq のフローセルコンパートメントのドアを開け、更にフローセルラッチを開けて使用済みのフローセルを取り出す。この時、中のフローセルが飛び出さないように、ラッチの上面に手を当てた状態でラッチを開ける銀色のボタンを押し、急なラッチの跳ね上がりを防ぐとよい。フローセルラッチの台座に埃や析出したバッファーがある場合には、フローセルを磨いたレンズティッシュで拭き取る。
- 10) フローセルを台座の所定の位置に載せ、カチッと音がするまでラッチを静かに押し下げ固定する。
- 11) MiSeq コントロールソフトウェア (MCS) の画面左下をチェックし、フローセルに記された ID (RFID) の読み取りがうまくいっていることを確認する。RFID が読まれていたら、フローセルコンパートメントのドアを閉め、Next ボタンを押す。
- 12) 冷蔵保存の PR2 ボトル (シーケンスバッファー) を取り出し、軽く混和してからス

クリューキャップを開ける。

- 13) MiSeq の試薬コンパートメントのドアを開け、シッパーハンドルを引き上げる。右側の部分に冷蔵保存の PR2 ボトルをセットし、廃液ボトルを空にする。セットが完了したらシッパーハンドルを必ず引き下げること。

注意:シッパーハンドルを引き下げなくてもランが始まってしまうので注意すること。引き下げないとバッファーを吸い取ることができないので（おそらくは）ランが停止してしまう。

- 14) MCS の画面左下をチェックして、RP2 のボトルに記された ID (RFID) が読み込まれていることを確認する。
- 15) 試薬チラーのドアを開け、ウォッシュカートリッジに挿入されているシッパーが完全に引き上げられるまで待つ。シッパーが上がる前にウォッシュカートリッジを引き出そうとすると、シッパーが折れてしまうので注意すること。
- 16) ライブラリーが充填された試薬カートリッジを試薬チラーに挿入する。最後まで押し込まないと試薬チラーのドアが閉まらないので注意すること。
- 17) 試薬チラーのドアを閉める。MCS の画面左下をチェックして、試薬カートリッジに記された ID (RFID) の読み取りがうまくいっているかどうか確認する。
- 18) ここまで操作が順調に進むと、画面上に実験名と解析ワークフローが表示されるので確認する。画面左下でサンプルシートのフォルダーの階層を確認して Next を押す。
- 19) プレランチェックの画面に移行する。チェック項目が表示され、全ての項目にチェックが入ると Start Run ボタンがアクティブになる。ランを開始してよければボタンを押す。
- 20) Start Run ボタンを押してからしばらくの間はシーケンスの初期トラブルが発生しやすい。試薬がフローセルに流れ込むまではランの再開が可能な場合があるので、5 分間ほどは MiSeq ランの進行を機器の前で見守るとよい。

参考文献

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., Iwasaki, W. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2 (7): 150088. doi: 10.1098/rsos.150088

図 5-2-1-1

殺菌灯式電気消毒器で紫外線消毒中のマイクロピペット、フィルターチップ、チューブ、チューブラックなど。実験を始める前に必ず消毒する習慣をつけると、実験室由来のコンタミのリスクが減る。



図 5-2-1-1-1

同一サンプルに対して8連チューブ 1本をつかった8繰り返し1st PCRをセットアップしたところ。右写真の場合、サンプル数は5で濾過ブランク、抽出ブランク、1st PCR ブランクの計3本を含む。

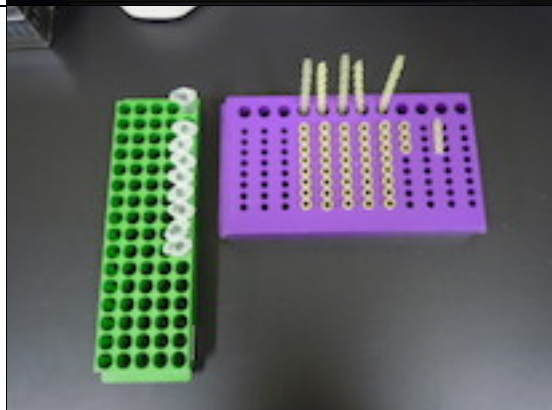


図 5-2-1-2-1

GeneRead Size Selection Kit と追加注文した 2.0mL コレクションチューブ。



図 5-2-1-2-2

8 繰り返しの 1st PCR 産物を 1 本の 1.5mL チューブにまとめているところ。

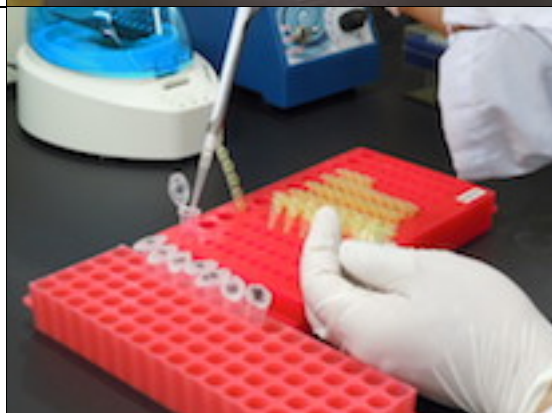


図 5-2-1-2-3

まとめた産物に対して 4 倍量の SB1 を加えてピペッティング。



図 5-2-1-2-4

スピncラムを用意しキャップに必要事項を記入する。



図 5-2-1-2-5

混和した PCR 産物 + SB1 溶液をカラムに注ぐ。

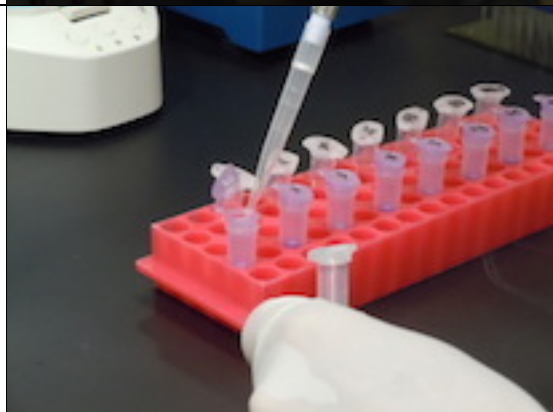


図 5-2-1-2-6

20,000g で 1 分間遠心する。



図 5-2-1-2-7

カラムを新しいコレクションチューブに載せ替える。

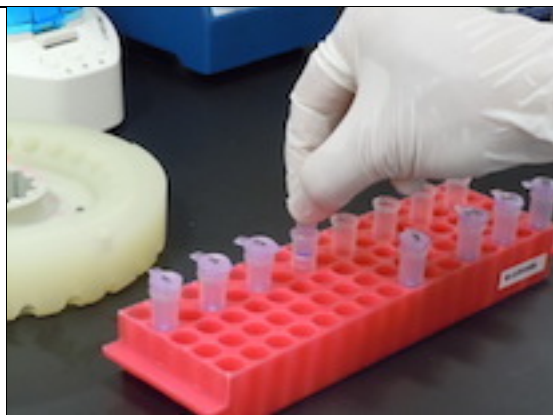


図 5-2-1-2-8

使用済みのコレクションチューブと廃液を廃棄する。



図 5-2-1-2-9

カラムに 700 μ L の 80%エタノールを注ぐ。



図 5-2-1-2-10

20,000g で 1 分間遠心する。



図 5-2-1-2-11

カラムを 1.5mL チューブに載せ替える。

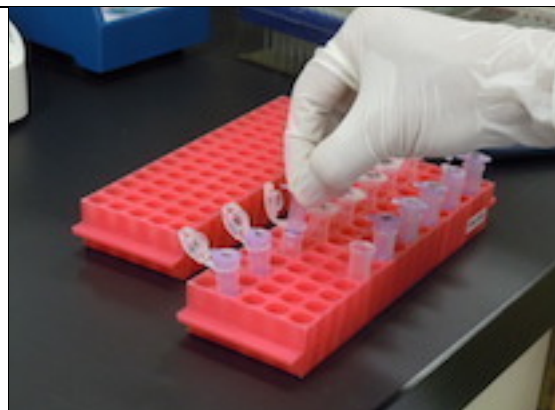


図 5-2-1-2-12

カラムのメンブレン上に 90 μ L の TE バッファーを注いで 1 分間静置し、20,000g で 1 分間遠心する。



図 5-2-1-2-13

回収した溶液（1 回目の精製を行った PCR 産物）に 4 倍量の SB1 を加えてピペッティング。



図 5-2-1-2-14

混和した溶液をカラムに注ぐ。

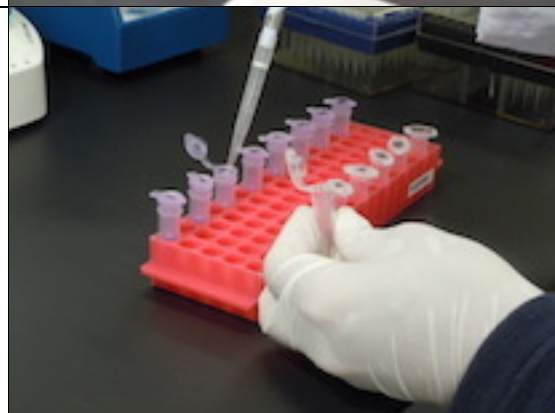


図 5-2-1-2-15

2回目の精製を終え、カラムのメンブレン上に17 μ LのEBバッファを注いでいるところ。1分間静置した後、20,000gで1分間遠心する。

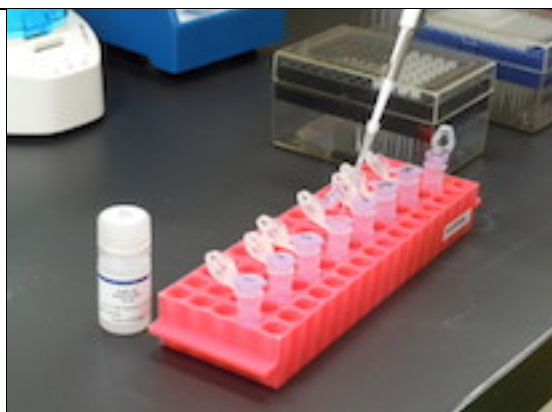


図 5-2-1-2-16

1.5mL チューブ (DNA 低吸着) に精製された 1st PCR 産物を回収したところ。



図 5-2-1-2-17

-20℃で冷凍保存する。



図 5-2-1-3-1

TapeStation 2200 用のキット。High Sensitivity D1000 Screen Tape (左) と試薬 (右)。



図 5-2-1-3-2

TapeStation 2200 付属のコンピューターを起動する。

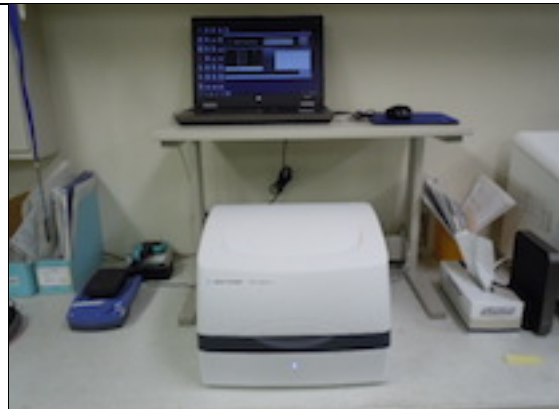


図 5-2-1-3-3

ScreenTape と必要な数のピペットチップをセットする。



図 5-2-1-3-4

Buffer 2 μ L を電動マイクロピペットを使用して分注する。

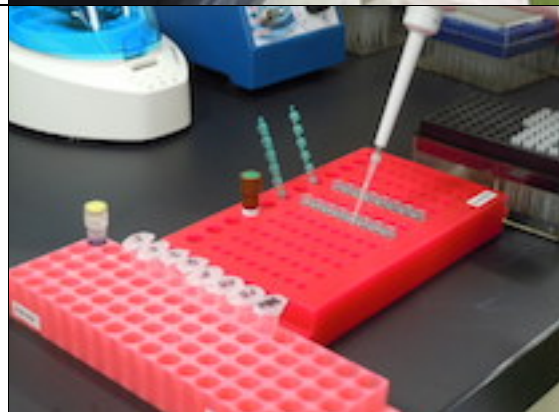


図 5-2-1-3-5

ラダーを 1 本目のチューブに 2 μ L 注ぐ。



図 5-2-1-3-6

精製濃縮済み 1st PCR 産物を 2 μ L 注ぐ。

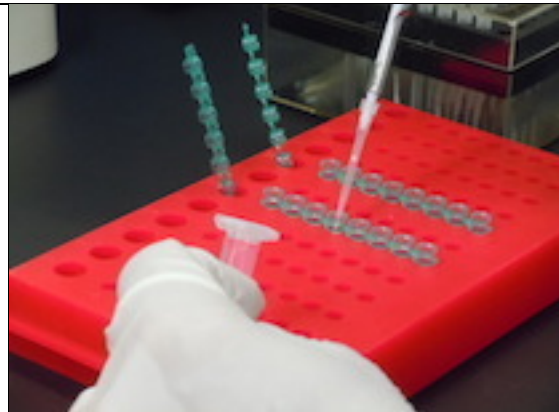


図 5-2-1-3-7

2000rpm で 1 分間攪拌した後、卓上小型遠心機で液をチューブの底に集める。



図 5-2-1-3-8

8 連チューブのキャップを中の液が飛び散らないように静かに開け、TapeStation 2200 のカセットにセットする。



図 5-2-1-3-9

全てがセットされた状態の TapeStation 2200。




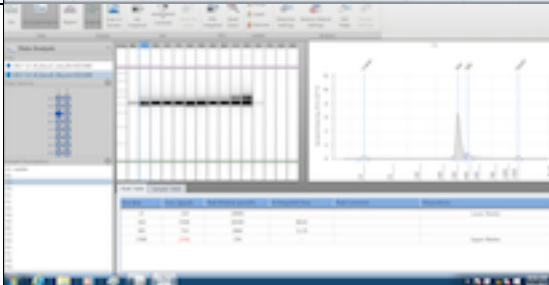

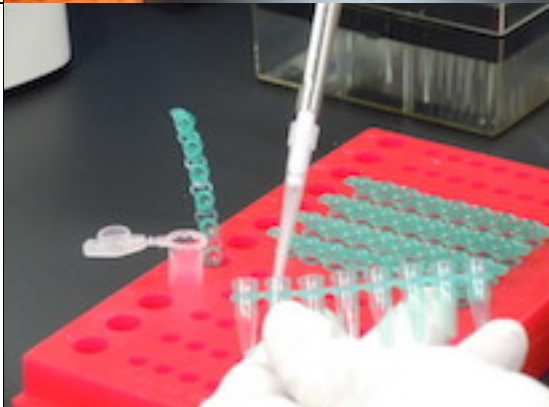
<p>図 5-2-1-3-10 左側の 8 連チューブのイメージ像で、ラダーと測定する PCR 産物とチューブ上での並びを画面上で指定する。</p>	
<p>図 5-2-1-3-11 ターゲットのバンド (約 310bp) がフェログラムと共に表示される。</p>	
<p>図 5-2-2-1-1 サンプル数が 40 の場合。</p>	
<p>図 5-2-2-1-2 反応溶液を全量 1 本のチューブにまとめる。</p>	

図 5-2-2-2-1

コームを注意深く取り外す。

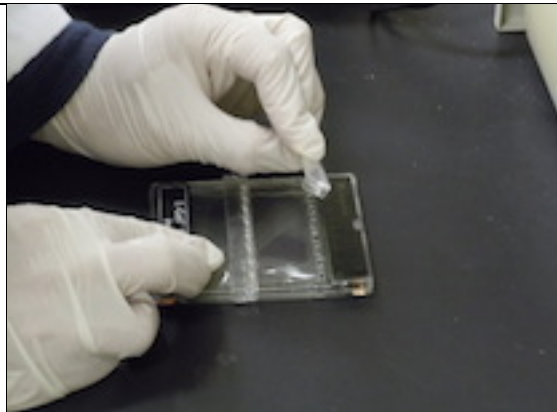


図 5-2-2-2-2

ゲルの右側から iBase に挿入する。



図 5-2-2-2-3

産物をローディングする。

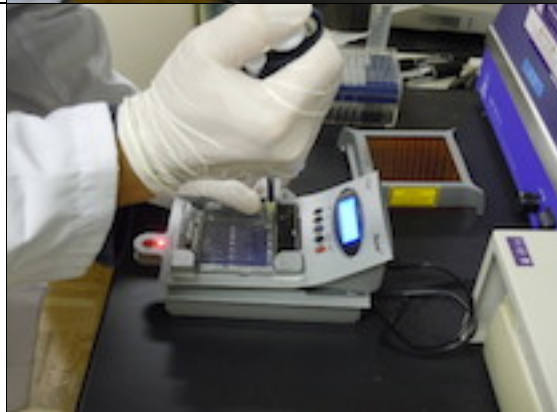


図 5-2-2-2-4

iBase に観察用プレートユニット（オレンジ色のフィルター付きユニット）をセットする。



図 5-2-2-2-5

基準線に到達したターゲット産物（約 370bp）。左から二番目がラダー（サイズマーカー）で、基準線に達している明るいラダーが 350bp になる。そのやや上にターゲット産物（370bp）があり、さらにその上にスメアと共に見られるバンドは非特異的産物なので、回収ウェルに入れないように注意する。

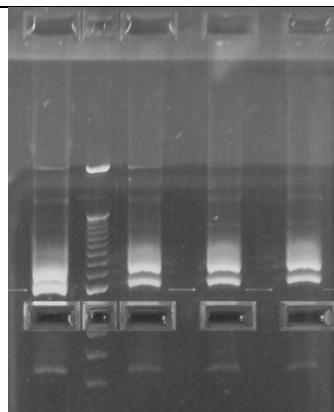


図 5-2-2-2-5

泳動した産物を回収する。

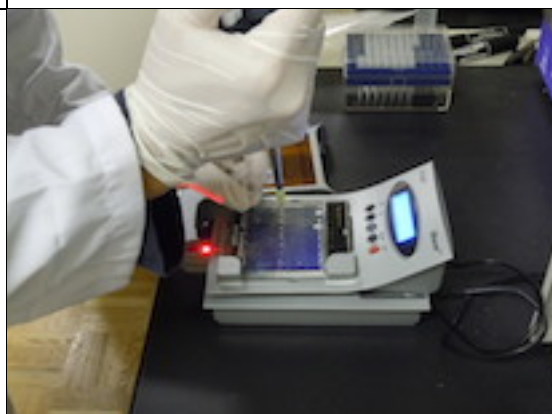


図 5-2-2-3-1

Qubit dsDNA HS Assay キットを冷蔵庫から取り出し 30 分以上かけて室温に戻す。



図 5-2-2-3-2

新しいチューブに Qubit Buffer を入れる。



図 5-2-2-3-3

Qubit Reagent を入れる。

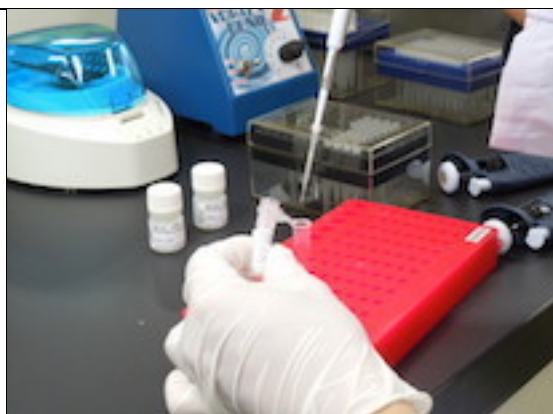


図 5-2-2-3-4

スタンダード#1 と#2 をそれぞれのチューブに 10 μ L ずつ入れる。



図 5-2-2-3-5

チューブにライブラリーを 2 μ L 入れる。

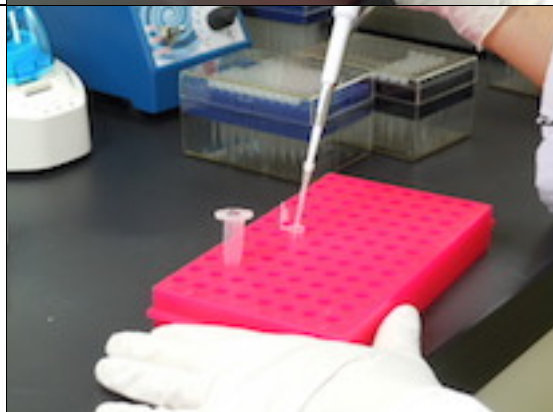


図 5-2-2-3-6

2 分間室温で静置する。この操作を怠ると計測値が安定しない。



図 5-2-2-3-7

Qubit 2.0 Fluorometer の画面をタッチして起動する。



図 5-2-2-3-8

スタンダード#1 と#2 を Qubit の指示に従って順番に測定する。



図 5-2-2-3-9

サンプルの濃度を計測しているところ。

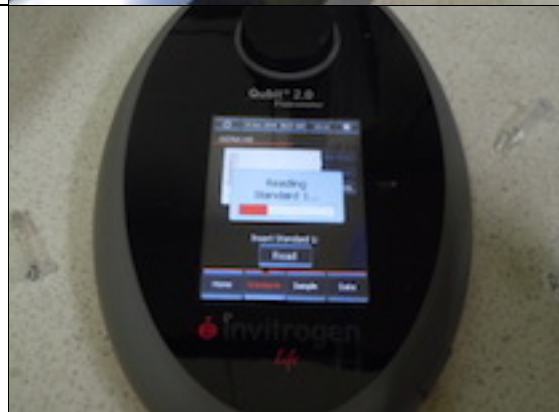


図 5-2-2-3-10

テンプレートを 100 倍希釈した計測値 (ng/mL) が表示される



図 5-2-3-A

冷凍保存品の HT1 チューブ (手前右) と
試薬カートリッジ (手前左)。このボック
スが冷蔵で解凍状態で送付されたら、納入
業者にクレームをつけてリブレース品を送
ってもらうこと。



図 5-2-3-B

冷蔵保存品の PR2 ボトル (中央) とフロ
ーセル (右)。これらが凍結されて送付さ
れたら、納入業者にクレームをつけてリブ
レース品を送ってもらうこと。



図 5-2-3-1-1

Tween 20 原液。



図 5-2-3-1-2

50mL 遠沈管に 5mL の Tween 20 を注意
深く注ぐ。Tween 原液は粘性が高いので
取り扱いに注意すること。



図 5-2-3-1-3

10%の Tween 20 溶液 25mL を 500mL
の洗浄瓶に入れる。

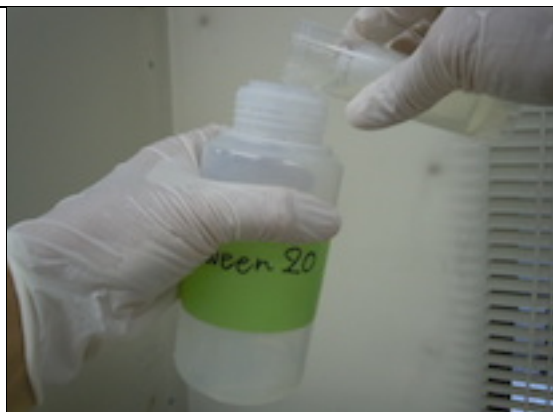


図 5-2-3-1-4

洗浄瓶を使ってウォッシュカートリッジに
ウォッシュ液を注入する。



図 5-2-3-1-5

すべて注ぎ終わったら残りのウォッシュ液を
ウォッシュボトル (350mL 程度) に移し
替える。



図 5-2-3-1-6

MiSeq コントロールソフトウェア
(MCS) のトップ画面。







<p>図 5-2-3-1-7 Perform Wash ボタンを押と 3 通りのウォッシュが表示される。</p>	
<p>図 5-2-3-1-8 使用済みフローセルがフローセルコンパートメントにセットされていることを確認する。</p>	
<p>図 5-2-3-1-9 試薬カートリッジやボトルが取り出される様子が画面に現れる。</p>	
<p>図 5-2-3-1-10 用意したウォッシュカートリッジを試薬トレーに入れる。</p>	

図 5-2-3-1-11

用意したウォッシュボトルをセットする。



図 5-2-3-1-12

セットが完了したらシッパーハンドルを引き下げる。ハンドルを引き下げるのを忘れてもランが始まってしまうので注意すること。



図 5-2-3-1-13

画面右下の Next を押すとウォッシュが始まる。



図 5-2-3-1-14

全ての工程が終わると右下に Done と表示される。







<p>図 5-2-3-1-15 次亜塩素酸溶液用専用チューブ（イルミナ社のサポートに連絡すると無料で送付してくれる）。</p>	
<p>図 5-2-3-1-16 17 番ポートに次亜塩素酸溶液が入った専用チューブを入れる。</p>	
<p>図 5-2-3-1-17 MiSeq コントロールソフトウェアが起動してシークエンスの準備が始まる。</p>	
<p>図 5-2-3-2-1 HT1 バッファークのチューブを入れ、カートリッジの側面にある最大水量線まで脱イオン水を静かに注ぐ。1 時間放置して完全に試薬を解凍する。</p>	

図 5-2-3-2-2

試薬カートリッジの番号はバーコードの真下に書かれている。小さく読みにくいので転記する際に間違えないように注意すること。



図 5-2-3-4-1

キムタオルを敷いた実験台の上にカートリッジを何回か軽く叩きつけて試薬類をチューブの底に落とす。



図 5-2-3-4-2

1000 μ L のピペットチップをつかって注入ポートに大きな孔をまず開ける（オレンジ色の 17 番ポート）。その後、シッパー挿入時にチューブが折れないように各ポートの中心に小さな孔を開けておく（中の試薬にピペットの先が触れないように注意すること）。



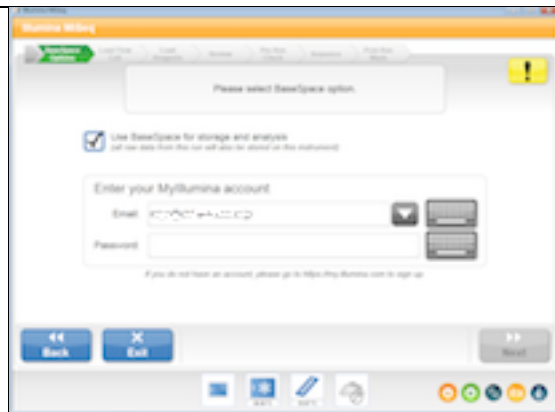
図 5-2-3-4-3

試薬カートリッジの注入ポート（オレンジ色）に 1200 μ L のピペットチップをつかって調整済みライブラリー 600 μ L を入れる。



図 5-2-3-4-4

SEQUENCE ボタンを押すと BaseSpace
の確認ボタンが表示される。



引用について

本マニュアルを引用する場合は以下のような引用方法を推奨します。

マニュアル全体

環境 DNA 学会 (2020) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2.

第 2 章

清野聡子, 源利文 (2020) 調査地点の選定. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会 (編) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2. 6-11 頁.

第 3 章

宮正樹, 佐土哲也 (2020) 採水とカートリッジ式フィルターを用いた現場濾過. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会 (編) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2. 13-25 頁.
源利文 (2020) 採水とグラスファイバーフィルターを用いた実験室での濾過. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会 (編) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2. 26-32 頁.

第 4 章

宮正樹, 佐土哲也 (2020) カートリッジ式フィルターからの DNA 抽出. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会 (編) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2. 34-46 頁.
源利文 (2020) グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会 (編) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2. 47-56 頁.

第 5 章

源利文 (2020) リアルタイム PCR による環境 DNA の種特異的検出・定量. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会 (編) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2. 57-60 頁.
宮正樹, 佐土哲也 (2020) MiFish メタバーコーディング. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会 (編) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2. 61-104 頁.

環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 2.2 (2020 年 4 月 3 日発行)

© 2020 一般社団法人環境 DNA 学会

© 2020 The eDNA Society