



田辺晶史

生態学のための  
メタバーコーディング  
とDNAバーコーディング

# 採集・分子実験編



生態学のためのメタバーコーディングと DNA バーコーディング：  
採集・分子実験編

田辺晶史

2020 年 1 月 23 日



# 目次

はじめに	1
第 1 章 環境 DNA・メタゲノム DNA の採集方法	3
1.1 サンプリングデザイン	3
1.2 テクニカルレプリケートについて	4
1.3 ネガティブコントロールについて	4
1.4 水からの濾過採集方法	5
1.4.1 濾過フィルターの選定	5
1.4.2 濾過方法の選定	6
1.4.3 サンプル固定方法の選定	7
1.4.4 濾過採集関連機材の塩素漂白の方法	7
必要な機材	7
必要な消耗品	7
作業手順	8
1.4.5 使い捨てピーカー・折りたたみバケツ・ポリタンクを使用した採水の方法	8
必要な機材	8
必要な消耗品	8
作業手順	9
1.4.6 吸引濾過装置を用いた水からの微生物メタゲノム DNA・環境 DNA の濾過採集方法	9
必要な機材	9
必要な消耗品	10
作業手順	10
記述しておくべきサンプル情報	11
1.4.7 シリンジを用いた水からのメタゲノム DNA・環境 DNA の濾過採集方法	12
必要な機材	12
必要な消耗品	12
作業手順	12
記述しておくべきサンプル情報	13
第 2 章 DNA 抽出・ライブラリ調製・シーケンシング	15
2.1 機材・試薬の滅菌と DNA 分解によるコンタミネーションの抑制	15
2.2 ピペット操作と電動ピペット	16
2.3 テクニカルレプリケートとネガティブコントロール	16
2.4 DNA 抽出	16

2.4.1	固形サンプル (濾過フィルター以外) からの DNA 抽出プロトコル	17
	必要な機材	17
	必要な試薬・消耗品	17
	作業手順	18
2.4.2	47mm ディスクフィルター (グラスファイバー) からの DNA 抽出プロトコル	19
	必要な機材	19
	必要な試薬・消耗品	19
	作業手順	20
2.4.3	47mm ディスクフィルター (ポリカーボネート・PVDF・PES) からの DNA 抽出プロトコル	21
	必要な機材	22
	必要な試薬・消耗品	22
	作業手順	22
2.4.4	Sterivex 水抜きサンプルからの DNA 抽出プロトコル	24
	必要な機材	24
	必要な試薬・消耗品	24
	作業手順	25
2.4.5	Sterivex 固定液入サンプルからの DNA 抽出プロトコル	27
	必要な機材	27
	必要な試薬・消耗品	27
	作業手順	27
2.4.6	磁気ビーズを用いた DNA の精製プロトコル	29
	必要な機材	29
	必要な試薬・消耗品	30
	作業手順	30
2.5	ライブラリ調製	30
2.5.1	チューブ・96 ウェルプレート・プレートシール・サーマルサイクラー・電動ピペットについて	30
2.5.2	プライマーの設計と発注の方法	31
	アダプター配列付きプライマー	32
	インデックス配列付きプライマー	33
2.5.3	アニーリング温度と DNA 合成酵素の決定	34
2.5.4	鋳型 DNA 希釈率の決定	35
2.5.5	ユニバーサルプライマーを用いた PCR のプロトコル (テスト用)	36
	必要な機材	36
	必要な試薬・消耗品	36
	作業手順	37
	PCR プログラム例	37
2.5.6	アガロースゲル電気泳動のプロトコル	38
	必要な機材	38
	必要な試薬・消耗品	38
	作業手順	38
2.5.7	ユニバーサルプライマーを用いた PCR のプロトコル (本番用)	39
	必要な機材	39

必要な試薬・消耗品	39
作業手順	40
PCR プログラム例	40
2.5.8 磁気ビーズを用いた PCR 産物の精製プロトコル	41
必要な機材	41
必要な試薬・消耗品	41
作業手順	41
回収したい DNA サイズと MagNA 液の量の目安	42
2.5.9 磁気ビーズを用いた PCR 産物の濃度均一化プロトコル	42
必要な機材	43
必要な試薬・消耗品	43
作業手順	43
2.5.10 蛍光色素を用いた濃度測定結果に基づく濃度均一化プロトコル	44
必要な機材	44
必要な試薬・消耗品	44
作業手順	45
2.5.11 Exonuclease I を用いた PCR 産物の精製プロトコル	46
必要な機材	46
必要な試薬・消耗品	46
作業手順	46
2.5.12 インデックスと P5・P7 アダプター配列を付加する PCR のプロトコル	47
必要な機材	47
必要な試薬・消耗品	47
作業手順	47
PCR プログラム	48
2.5.13 インデックス付きサンプルをひとまとめにする作業のプロトコル	49
必要な機材	49
必要な試薬・消耗品	49
作業手順	49
2.5.14 E-Gel SizeSelect によるサイズ選択	49
必要な機材	49
必要な試薬・消耗品	50
作業手順	50
回収したい DNA サイズと MagNA 液の量の目安	51
セットする泳動時間の目安	51
2.5.15 アガロースゲル電気泳動とゲルからの DNA 回収によるサイズ選択のプロトコル	52
必要な機材	52
必要な試薬・消耗品	52
作業手順	53
回収したい DNA サイズと MagNA 液の量の目安	54
2.6 ライブラリのクオリティチェック	54
2.6.1 Qubit による濃度測定と希釈	54

	必要な機材	54
	必要な試薬・消耗品	55
	作業手順	55
2.6.2	アガロースゲル電気泳動のプロトコル (高分解能版)	56
	必要な機材	56
	必要な試薬・消耗品	57
	作業手順	57
2.7	MiSeq によるシーケンス	58
	必要な機材	58
	必要な試薬・消耗品	58
	作業手順	58
引用文献		60
付録 A	使用機材の自作	61
A.1	漂白剤抜き器の作成	61
	必要な機材	61
	必要な部材	61
	作業手順	61
A.2	車載用吸引ポンプユニットの作成	62
	必要な機材	62
	必要な部材	62
	作業手順	62
A.3	吸引濾過装置の作成	63
	必要な機材	63
	必要な部材	63
	作業手順	63
A.4	プラスチックバッグと濾過フィルターユニットの接続アダプターの作成	64
	必要な機材	64
	必要な部材	64
	作業手順	64
A.5	96 ウェルプレート用磁気スタンドの自作	65
	必要な機材	65
	必要な部材	65
	作業手順	65
A.6	青色 LED トランスイルミネーターの自作	65
	必要な機材	65
	必要な部材	65
	作業手順	66
A.7	青色 LED トランスイルミネーター用フィルターカバーの自作	67
	必要な機材	67
	必要な部材	68



	作業手順	68
A.8	ゲル撮影装置の自作その 1	68
	必要な部材	68
	作業手順	69
A.9	ゲル撮影装置の自作その 2	69
	必要な機材	69
	必要な部材	69
	作業手順	70
付録 B	試薬の調製	73
B.1	DNA・RNA 固定液の調製	73
B.1.1	1M クエン酸ナトリウム	73
	必要な機材	73
	必要な試薬・消耗品	73
	作業手順	74
B.1.2	DNA・RNA 固定液	74
	必要な機材	74
	必要な試薬・消耗品	74
	作業手順	74
B.2	DNA 抽出用試薬の調製	75
B.2.1	IDTE	75
	必要な機材	75
	必要な試薬・消耗品	75
	作業手順	75
B.2.2	1M NaCl	76
	必要な機材	76
	必要な試薬・消耗品	76
	作業手順	76
B.2.3	0.1M Tris-HCl pH6.4	76
	必要な機材	76
	必要な試薬・消耗品	77
	作業手順	77
B.2.4	Insect Lysis Buffer	77
	必要な機材	77
	必要な試薬・消耗品	77
	作業手順	78
B.2.5	Column Binding Buffer	78
	必要な機材	78
	必要な試薬・消耗品	78
	作業手順	78
B.2.6	Wash Buffer 1	79
	必要な機材	79

	必要な試薬・消耗品 . . . . .	79
	作業手順 . . . . .	79
B.2.7	Wash Buffer 2 . . . . .	79
	必要な機材 . . . . .	79
	必要な試薬・消耗品 . . . . .	80
	作業手順 . . . . .	80
B.3	PCR 用 10x ローディングダイの調製 . . . . .	80
	必要な機材 . . . . .	80
	必要な試薬・消耗品 . . . . .	81
	作業手順 . . . . .	81
B.4	PCR 産物精製用磁気ビーズ (MagNA) 液の調製 . . . . .	81
	必要な機材 . . . . .	81
	必要な試薬・消耗品 . . . . .	81
	作業手順 . . . . .	82
B.5	PCR 産物濃度均一化用磁気ビーズ (BeNUS) 液の調製 . . . . .	82
	必要な機材 . . . . .	82
	必要な試薬・消耗品 . . . . .	83
	作業手順 . . . . .	83

# はじめに

本書はクリエイティブ・コモンズの表示-継承 4.0 国際ライセンスの下で配布します。このライセンスの下では、原作者の明示を行う限り、利用者は自由に本書を複製・頒布・展示することができます。また、原作者の明示と本ライセンスまたは互換性のあるライセンスの適用を行う限り、本書を改変した二次著作物の作成・配布も自由に行うことができます。詳しい使用許諾条件を見るには

<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

をチェックするか、クリエイティブ・コモンズに郵便にてお問い合わせ下さい。住所は Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA です。

本書が皆さんの役に立つことができましたら幸いです。この機会を与えて下さった京大大学生態学研究センターの東樹宏和博士、宇野裕美博士、神戸大学の末次健司博士、佐藤拓哉博士、水産研究・教育機構中央水産研究所の長井敏博士、龍谷大学の山中裕樹博士、東北大学の近藤倫生博士と、本書をお読みの皆さんに感謝します。



## 第 1 章

# 環境 DNA・メタゲノム DNA の採集方法

ここでは、水からの環境 DNA 採集、および水、土壌、糞などからのメタゲノム DNA の採集方法について解説します。DNA 抽出用の個体や組織の採集方法はここでは取り扱いません。なお、環境 DNA とメタゲノム DNA は識別困難ですが、ここでは、環境 DNA を「生物個体から排出された DNA」、メタゲノム DNA を「生物個体から排出されていない DNA」ということにします。したがって、水中の魚類や甲殻類、水生昆虫、水生植物の DNA は環境 DNA であり、微生物の DNA はメタゲノム DNA であることが多いでしょう（ただし、区別できないだけで微生物の環境 DNA も含まれているでしょう）。また、未消化物に含まれる被食者や本人の DNA はどちらにするか難しいところですが、とりあえずメタゲノム DNA ということにしておきます。

### 1.1 サンプルングデザイン

採集地点・時間をどのように配置するかは研究の内容に直結する重要な課題です。ここで研究目的の達成の可否が決まると言っても過言ではありません。そのためには、研究目的の明確化と予備調査が必須です。

例えば、ため池ごとの魚類相と環境条件（池の大きさ、深さ、水質、地質、高度、緯度経度など）との関連性を解明したいが、ため池の中での微細な違いには興味がないケースでは、ため池がよほど小さくない限り、ため池内の数地点から水を採集し、混合して濾過採集することになります。ため池が非常に小さい場合や、ため池内の水が十分に混合されていたり、対象となるため池があまりに多い場合は、1 地点だけでため池を代表させることもあるでしょう。もちろん、余裕があるならため池内の数地点のサンプルを全て別々にして、その気になればため池内の微細な違いをも解析可能にしておくことも悪くありませんが、後述するサンプルレプリケートを複数用意することを考えると、大きな労力が必要となりますので、人手を十分考慮する必要があります。また、その場合はため池内の数地点のサンプル間で DNA 抽出効率・PCR 増幅効率などに大きな違いが生じることがないようにしなければなりません（違う場合は環境条件の影響と言えなくなってしまう）。

別のケースとして、森林の土壌を分析して、微生物叢と植物相の関連性を解明したい場合を考えましょう。この場合、1 地点を広くかつ深く取り、その範囲の土壌を混合して採集するか、その範囲の土壌からいくつかのサブサンプルを採集して混合するのがよいでしょう。土壌では、少し離れただけで全く異なる微生物叢を示すので、ある場の植物相と対応する微生物叢を完全な 1 点では代表することができません。そのため、植物相と対応する範囲の数地点のサブサンプルをプールすることで代表させます。

以上のように、「DNA の拡散する範囲」と「そのサンプルで代表させたい範囲」を考慮して、前者の範囲の方が広くなるようにサンプリングデザインを行う必要があります。後者の範囲の方が広がってしまう場合、研究の目的とする議論が行えなくなることがあります。ただ、後者の範囲の方が広くなる場合でも、サンプルが大量にあるのであれば、「本来の生物相」と「サンプルの生物相」との乖離に何らかの偏りが無い限りは目的の議論ができる場合もあるでしょう。

また、濾過採集を行う場合、濾過水量も結果に大きな影響を及ぼすことが知られています。ただ、無制限に濾過水量を増やすことは不可能なため、現実的に実施可能な範囲で最大の水量を濾過するようにしている例が多いようです。

## 1.2 テクニカルレプリケートについて

1 サンプルを 1 レプリケートで採集した場合、DNA 抽出効率や PCR 増幅効率のばらつきの影響を受けます。また、レアな種のゲノム DNA や低濃度の環境 DNA はサンプルに入ったり入らなかったりすることもあり得ます。そこで、可能であれば複数 (3 以上ならなお良い) のレプリケートを 1 サンプル中に用意することが望ましくなります。このようにすることで、各サンプルごとに種の「発見率」を推定することができます。例えば、1 サンプルが 10 レプリケート含んでいるとき、x 軸をレプリケート数、y 軸を合計種数とする折れ線グラフを描くことを想像して下さい。10 レプリケートから x 軸のレプリケート数だけ無作為抽出して合計種数を算出して y 軸の合計種数を計算します。このとき、折れ線が傾きゼロの直線なら 1 レプリケートでも発見率は 100% と考えられ、 $x=1$  では傾きゼロではなくとも、 $x=10$  では傾きゼロになっているなら 10 レプリケート合計すれば飽和している＝発見率 100% ということになります。しかし、 $x=10$  でも線が傾いているようであれば、発見率は 100% ではなく、いくらか取りこぼしがあることがわかります。発見率が 100% であることが理想ですが、必ずしもそうである必要はありません。重要なのは、発見率が推定できることです。

## 1.3 ネガティブコントロールについて

この先の分析では、サンプル間のコンタミネーションを完全に防ぐことは難しいため、それを検出し、コンタミネーションの程度を推定できるよう、ネガティブコントロールサンプルを適宜作成することが求められます。よく勘違いしている人がいますが、ネガティブコントロールの目的は、「コンタミネーションの程度を推定する」ことであって、「コンタミネーションが一切ないことを確認できるようにすること」ではありません (やってみればわかりますが、実際にはほぼ不可能で現実的ではありません)。野外調査の際は、対象とする環境 DNA が含まれていないと考えられる水 (アズワン工業用精製水 A300 (2-961-01) を推奨。コックまで付属してしながら安価で大容量) を用意しておき、サンプルの水と同じ手順で濾過することでネガティブコントロールとします。なお、研究室で予めプラスチックバッグに詰めて持って行ってしまうと、プラスチックバッグに水を詰めるまでに経由する機材 (使い捨てピーカーや「空気」) へのコンタミネーションの程度がわからなくなってしまうので、ネガティブコントロールとしては適切ではありません。ネガティブコントロールは「サンプルの水と同じ手順で濾過する」ことが必要であることに注意して下さい。

## 1.4 水からの濾過採集方法

### 1.4.1 濾過フィルターの選定

メタゲノム・環境 DNA 採集に適した濾過フィルターには、形状・材質・粒子保持能で分けると以下の種類があります。ディスクフィルターはひとまず 47mm のものを挙げておきますが、より小さいものや大きいものもあります。

- カートリッジ型フィルター
  - PVDF 製濾過膜
    - \* 0.45 $\mu$ m Millipore Sterivex-HV SVHV010RS
    - \* 0.22 $\mu$ m Millipore Sterivex-GV SVGV010RS
  - PES 製濾過膜
    - \* 0.22 $\mu$ m Millipore Sterivex-GP SVGP01050
- 47mm ディスクフィルター
  - グラスファイバー製濾紙
    - \* 1.2 $\mu$ m Whatman GF/C 1822-047
    - \* 0.7 $\mu$ m Whatman GF/F 1825-047
    - \* 0.7 $\mu$ m Millipore AP40 AP4004705
  - ポリカーボネート製濾過膜
    - \* 12.0 $\mu$ m Whatman Nuclepore 111116
    - \* 10.0 $\mu$ m Whatman Nuclepore 111115
    - \* 10.0 $\mu$ m Millipore Isopore TCTP04700
    - \* 8.0 $\mu$ m Millipore Isopore TETP04700
    - \* 5.0 $\mu$ m Millipore Isopore TMTP04700
    - \* 3.0 $\mu$ m Whatman Nuclepore 111112
    - \* 3.0 $\mu$ m Millipore Isopore TSTP04700
    - \* 2.0 $\mu$ m Whatman Nuclepore 111111
    - \* 2.0 $\mu$ m Millipore Isopore TTTP04700
    - \* 1.2 $\mu$ m Millipore Isopore RTTP04700
    - \* 1.0 $\mu$ m Whatman Nuclepore 111110
    - \* 0.8 $\mu$ m Millipore Isopore ATTP04700
    - \* 0.6 $\mu$ m Millipore Isopore DTTP04700
    - \* 0.4 $\mu$ m Millipore Isopore HTTP04700
    - \* 0.22 $\mu$ m Millipore Isopore GTTP04700
  - セルロース混合エステル製濾過膜
    - \* 8.0 $\mu$ m Millipore MF-Millipore SCWP04700
    - \* 5.0 $\mu$ m Millipore MF-Millipore SMWP04700
    - \* 3.0 $\mu$ m Millipore MF-Millipore SSWP04700
    - \* 1.2 $\mu$ m Millipore MF-Millipore RAWP04700

- \* 0.8 $\mu$ m Millipore MF-Millipore AAWP04700
- \* 0.65 $\mu$ m Millipore MF-Millipore DAWP04700
- \* 0.45 $\mu$ m Millipore MF-Millipore HAWP04700
- \* 0.3 $\mu$ m Millipore MF-Millipore PHWP04700
- \* 0.22 $\mu$ m Millipore MF-Millipore GSWP04700
- PVDF 製濾過膜
  - \* 0.45 $\mu$ m Millipore Durapore HVLP04700
  - \* 0.22 $\mu$ m Millipore Durapore GVWP04700
- PES 製濾過膜
  - \* 0.45 $\mu$ m Millipore Millipore Express PLUS HPWP04700
  - \* 0.22 $\mu$ m Millipore Millipore Express PLUS GPWP04700

カートリッジ型の方が事前に塩素漂白しないといけないものが少なく準備が楽で、コンタミネーションはしにくいと考えられます。ただし高価で濾過膜の選択肢が少ないというデメリットがあります。ディスクフィルターは事前に塩素漂白しないといけないものが多いため準備の手間が多く、コンタミネーションしやすいですが、その代わり安価で濾過膜の選択肢が多くあります。保存時の占有スペースはディスクフィルターの方が圧倒的に小さいので、冷凍庫により多く入れられます。

ポリカーボネート製濾過膜は孔径が極めて均一で粒子サイズごとの分画に適し、様々な孔径の品が揃えられています。デメリットとしては、空隙率が低く濾過が遅い、目詰まりしやすい、そして高価という点があります。セルロース混合エステルは孔径はポリカーボネートほど均一ではありませんが、孔径の選択肢は多く、空隙率が非常に高いため濾過が早い上、ポリカーボネートに比べれば安価です。ポリエーテルスルホン (PES) とポリフッ化ビニリデン (PVDF) も空隙率が高く濾過はポリカーボネートよりずっと早くなります。グラスファイバーもポリカーボネートに比べて空隙率が高く濾過はずっと早いですが、孔径の均一性は最も低く、その上 DNA・RNA を吸着しやすい性質があります (DNA・RNA の抽出にも利用されるくらいです)。しかし、グラスファイバーが最も安価です。

また、濾過フィルターの選択は DNA の抽出方法にも影響を及ぼします。カートリッジ型の場合、バッファーを注入してインキュベートすることでバッファー中に DNA を溶解させ、逆さまにして遠心することで回収します (Miya *et al.*, 2016)。微生物メタゲノムの場合、ジルコニアビーズなどをカートリッジ内に入れて破碎処理を加えることで抽出効率を改善することもできます (Ushio, 2019)。ディスクフィルターからの環境 DNA の回収では、最初にフィルターを筒状に丸めてザリベットや空カラム (吸着剤の入っていないスピнкаラム) に入れ、そこにバッファーを加えてインキュベートすることで DNA を溶解します。ディスクフィルターから微生物メタゲノムを回収する場合、バッファー中でフィルターを切り刻んでジルコニアビーズを加えて破碎処理を行います。このため、グラスファイバー製の剪刃で刻みにくいフィルターは使用できません。

#### 1.4.2 濾過方法の選定

濾過の方法には、以下の 4 通りがあります。

1. シリンジを用いて手動で加圧する
2. 真空ポンプを手動で動かして吸引する



3. ペリスタルティックポンプなどを電気で動かして加圧する
4. 真空ポンプを電気で動かして吸引する

どの方法を用いても構いませんが、電気が使えない場所では 1 を、電気が使える場所では 4 を使うのが主になると思います。採水後にすぐには濾過できない場合、10% 塩化ベンザルコニウム溶液 (オスバン S という名前で薬局で販売されている) を 1L 当たり 1mL 加える (終濃度 0.01%) ことで、細菌による環境 DNA の分解を抑制できるという報告 (Yamanaka *et al.*, 2017) があり、近年よく利用されているようです。

### 1.4.3 サンプル固定方法の選定

濾過サンプルの固定方法は、主に以下の方法が考えられます。

1. 可能な限り水抜きして DNA・RNA 固定液 (作成法は付録 B.1 を参照) を加える
2. 可能な限り水抜きして TE バッファーを加える
3. 可能な限り水抜きしてエタノールを加える
4. 可能な限り水抜きして冷凍する

最近の論文を読む限りでは、1 と 4 がよく使われているようです。4 以外は冷蔵、あるいは常温保管することも可能です。

### 1.4.4 濾過採集関連機材の塩素漂白の方法

#### 必要な機材

- 水道
- 蛇口に適合するシリコンチューブ (厚さは任意): 1 本
- 漂白剤抜き器 (作成方法は付録 A.1 を参照): 1 個
- 漂白対象物が入る大きさの容器: 1 個
- 防水エプロン: 1 着
- ショーワグローブ No.140 腕カバー付厚手: 1 双

#### 必要な消耗品

- 花王 ハイター E (界面活性剤なしの塩素系漂白剤。次亜塩素酸ナトリウム 6%): 適量
- SPW: 適量

## 作業手順

1. 漂白対象物が入る大きさの容器に漂白対象物を入れる
2. 次に注ぐ水道水の 2~10% 量のハイター E を入れる
3. 漂白対象物が浸かるように水道水を注ぐ
4. 漂白対象物が水に浮く場合、同サイズの容器を重ねて重しを入れて押さえつける (これができるような形状の容器を使用する)
5. 時々ゆすりながら 10 分以上、できれば 1 時間以上浸ける (ただし浸け過ぎに注意)
6. 漂白液を捨てて漂白対象物を漂白剤抜き器に移す
7. 漂白剤抜き器のホースニップルと水道の蛇口をシリコンチューブで接続する
8. 水道水を上限まで注いで捨てる
9. 漂白対象物が
  - (a) 水に浮く場合、水道水を勢いよく流しっぱなしにして 30 分以上放置して水を捨てる (水の勢いで漂白対象物がぐるぐる動くようにする)
  - (b) 水に沈む場合、水道水を上限まで注いで捨てることを更に 2 回繰り返す
10. 漂白対象物が入る大きさの容器に漂白対象物に移す
11. SPW を漂白対象物が浸かるように注いですすいで捨てる
12. 乾燥が必要な場合はアルミホイルに包んで常温~60℃ で乾燥する (60℃ にする前に一度 200℃ 以上で庫内を滅菌してから 60℃ に下げること)

なお、漂白剤抜き器を漂白対象物が入る大きさの容器として使用しても問題ありません。また、全ての作業を同じ容器 (漂白剤抜き器を含む) で行っても構いません。フィルターホルダーはパッキンやアダプターを外して分解し、個別に漂白を行い、漂白後に組み立てます。

### 1.4.5 使い捨てビーカー・折りたたみバケツ・ポリタンクを使用した採水の方法

#### 必要な機材

- 漂白済みポリタンク: 1 個 / 1 サンプル
- 漂白済み折りたたみバケツ: 1 個 / 1 サンプル
- 漂白済みロープ (長さは任意): 1 本 / 1 サンプル

#### 必要な消耗品

- 以下のいずれかの使い捨てビーカー: 1 個 / 1 サンプル
  - 大塚刷毛製造 補修用カップ 容器のみ 400mL 3221110400
  - 大塚刷毛製造 補修用カップ 容器のみ 600mL 3221110600
  - 大塚刷毛製造 補修用カップ 容器のみ 800mL 3221110800
  - ビッグ 調色ミキシングカップ 1000mL MK11L

### 作業手順

1. 水深、水面までの距離、濾過作業できる場所までの距離、濾過作業できるようになるまでの時間に応じて、以下の方法から選択する
  - (a) 水面に手が届く場合、使い捨てビーカーで直接採水する
  - (b) 橋の上など、足場が高い場合、ロープで上から下ろしたバケツで水を汲む
  - (c) 濾過作業できる場所が遠い、またはすぐに濾過できない場合、ポリタンクに水を汲む。その際、水面までの距離や水深によっては使い捨てビーカーやバケツを使用してポリタンクに水を入れる

いずれの場合も、共洗いは最低2回以上行います。また、漂白したロープには漂白剤が僅かながら残留していることが多いので(繊維が入り組んでいるため完全に抜くのは難しい)、共洗いのついでに一度現場の水に漬け込みます。水を汲む際にも、ロープからの水ができるだけバケツ内に入らないように注意します。筆者はモノタロウ 折りたたみ式バケツ (09514944) を使用していますが、大変安価な上、折りたたんだ状態で漂白剤抜き器として使用しているアスベル ユニックス キッチンボックス S-70 にぴったり4個入り、漂白が大変楽に行えるのでおすすめです(折りたたんだ状態でもしっかり漂白できる構造です)。

### 1.4.6 吸引濾過装置を用いた水からの微生物メタゲノム DNA・環境 DNA の濾過採集方法

#### 必要な機材

- DC12V のシガーソケット搭載車 または AC アダプター: 1 個
- 車載用吸引ポンプユニット (作成方法は付録 A.2 を参照): 1 個
- 吸引濾過装置 (作成方法は付録 A.3 を参照): 1 個
- toolsisland 手動式オイルチェンジャー または メルテック オイルチェンジャー OC-060: 1 個
- アズワン 穴付きシリコン栓 8 号 (1-7650-01) の両方の穴に 光 ステンレス丸パイプ 外径 6mm を適当な長さに切断して挿したもの (長さを不揃いにする): 1 個
- アズワン シリコンチューブ 内径 5mm 外径 11mm 長さ 1m (6-586-19-01): 1 本
- アズワン シリコンチューブ 内径 5mm 外径 11mm 長さ 1m (6-586-19-01) を切断して途中に Whatman VACU-GUARD (6722-5000) を挟んだもの: 1 本
- モンキーレンチ: 1 本 (ディスクフィルター使用時のみ)
- サンダイヤ デッキ型ピンセット 125mm (アズワン品番 6-531-12): 1 本 (ディスクフィルター使用時のみ)
- ハサミ: 1 本
- ライター: 1 本
- ゼブラ マッキープロ細字 特殊用途 DX: 1 本 (色の薄いハズレ個体がよくあるので予め確認しておく)
- 三菱アルミニウム 三菱ホイル タフ 30cm x 50m: 1 本
- ロゴス ハイパー氷点下クーラー M No.81670070: 1 個
- ロゴス 倍速凍結・氷点下パック XL No.81660640: 2 個以上 (必ず氷点下を維持できる保冷剤を使用すること)

### 必要な消耗品

- 以下のいずれかの濾過フィルターユニット: 1 個 / 1 サンプル
  - アズワン FH-PP47 (3-6736-01) または ADVANTEC PP-47 に 47mm ディスクフィルターを詰めたもの (漂白で再利用可)
  - Millipore Sterivex-HV 0.45 $\mu$ m PVDF SVHV010RS
  - Millipore Sterivex-GV 0.22 $\mu$ m PVDF SVGV010RS
  - Millipore Sterivex-GP 0.22 $\mu$ m PES SVGP01050
- Sterivex 使用時に出口側に付ける 10 $\mu$ L チップ (フィルターなし)
- フィルターユニットに適合するアダプター (作成方法は付録 A.4 を参照): 1 個 / 1 サンプル (漂白で再利用可)
- 以下のいずれかのプラスチックバッグ: 1 個 / 1 サンプル
  - カウパック 夢パック 100mL DP16-TN0100
  - カウパック 夢パック 200mL DP16-TN0200
  - カウパック 夢パック 300mL DP16-TN0300
  - カウパック 夢パック 500mL DP16-TN0500
  - カウパック 夢パック 1000mL DP16-TN1000
- 以下のいずれかの使い捨てビーカー: 1 個 / 1 サンプル
  - 大塚刷毛製造 補修用カップ 容器のみ 400mL 3221110400
  - 大塚刷毛製造 補修用カップ 容器のみ 600mL 3221110600
  - 大塚刷毛製造 補修用カップ 容器のみ 800mL 3221110800
  - ビッグ 調色ミキシングカップ 1000mL MK11L
- セイニチ ユニパック C-4: 1 枚 / 1 サンプル
- 使い捨てポリ手袋: 2 双 / 1 サンプル

### 作業手順

1. 車載用吸引ポンプユニットのバルブは開放しておく
2. 吸引濾過装置のバルブは全て閉じておく
3. シガーソケットに車載用吸引ポンプユニットの電源を接続する
4. 車載用吸引ポンプユニットのホースニップルに VACU-GUARD を取り付けたシリコンチューブ経由で穴付きシリコン栓の短い方のステンレスパイプを接続する
5. 穴付きシリコン栓を手動式オイルチェンジャーのタンクに挿す
6. 穴付きシリコン栓の長い方のステンレスパイプにもう一つのシリコンチューブ経由で吸引濾過装置を接続する
7. ポリ手袋を着ける
8. 使い捨てビーカーで必要量の水試料を量り取り、プラスチックバッグに入れる
9. 濾過フィルターユニットにアダプターを取り付ける (ディスクフィルター使用の場合はモンキーレンチでしっかり締め付ける)
10. Sterivex の場合は出口側に 10 $\mu$ L チップを取り付け、Sterivex が直接濾過器に触れないようにする
11. アダプターの反対側に水試料の入ったプラスチックバッグを取り付ける (アダプターの接着面に力がかからないように注意すること)

12. プラスチックバッグ+濾過フィルターユニットを濾過フィルターユニットが下になるように吸引濾過装置に取り付け、リピートバンドを締める
13. 吸引濾過装置のバルブ (プラスチックバッグからタンクの経路上のもの) を開ける
14. 車載用吸引ポンプユニットの電源を入れ、水試料を吸引する
15. 水試料吸引開始後、プラスチックバッグ上端にハサミで切り込みを入れる (ハサミが水試料に接さないように注意。必要に応じてハサミをライターで火炎滅菌する)
16. 水試料の吸引が終わったら、吸引濾過装置の濾過フィルターユニット直下のバルブを閉じる
17. リピートバンドを緩めてプラスチックバッグ+濾過フィルターユニットを吸引濾過装置から外す
18. 濾過フィルターユニットからプラスチックバッグを取り外して捨てる (アダプターは残す)
19. 濾過フィルターユニットを再度吸引濾過装置に取り付け、濾過フィルターユニット直下のバルブを開けて濾過フィルターユニット内の残留水を吸引する (濾過フィルターユニットを独楽のように回して吸引する)
20. アルミホイルを適当な長さで切って折り目を付けておく
21. 吸引濾過装置の濾過フィルターユニット直下のバルブを閉じて車載用吸引ポンプユニットの電源を切る
22. 濾過フィルターユニットを吸引濾過装置から外す
23. ポリ手袋を交換する
24. 濾過フィルターユニットが
  - (a) フィルターホルダー+ディスクフィルターの場合、アダプターはそのままにして分解し、フィルターを分解してライターで火炎滅菌したピンセットで濾液入力面を内側にして二つ折りにし、アルミホイルで包んでマッキープロでサンプル情報を記述しユニパックに入れ、クーラーバッグに保冷剤で挟まれるように入れる
  - (b) Sterivex の場合、アダプターを外してマッキープロでサンプル情報を記述し、アルミホイルで包んでから (省略可) ユニパックに入れ、クーラーバッグに保冷剤で挟まれるように入れる (ユニパックにもサンプル情報を記述しておく)
25. ポリ手袋を外して捨てる
26. 吸引濾過装置の下部バルブを両方共開放する (吸引濾過装置内の残留水がタンクに吸い込まれる)
27. 手動式オイルチェンジャーのタンクからシリコン栓を外し、中の廃液を捨てる

#### 記述しておくべきサンプル情報

- 採集地点
- 採水日時
- 濾過日時
- 濾過量
- フィルター材質
- フィルター粒子保持能

なお、アズワン FH-PP47 および ADVANTEC PP-47 のパッキンが劣化した場合、シリコンゴムかフッ素ゴム製の AS568-030 型および AS568-033 型の品に交換することができます。

ここでは Sterivex をすぐに冷凍する方法を示しましたが、中に DNA・RNA 固定液 (作成法は付録 B.1 を参照) を注入して両端にキャップ (テルモ テルフュージョン三方活栓キャップ密栓用 XX-WS01K\* および コクゴ 点眼キャップ赤 3 φ 101-5210102) を付けて冷凍・冷蔵・常温保管する方法もあります (DNA・RNA 固定液を注入しない場合も DNA 抽

出時にはキャップを使用することになるので、採集時に付けておくのも良いでしょう)。海外などで冷凍手段が確保できない場合にはこの方法を用いることになります。

#### 1.4.7 シリンジを用いた水からのメタゲノム DNA・環境 DNA の濾過採集方法

##### 必要な機材

- コーキングガン タジマ コンボイ VS CNV-VS: 1 個 (先端の円筒部内側に、ワッシャーがくっつくようコクヨ マク-S340 をカットして貼っておく。また、ベスト 黒ゴム平置き 40 ミリをハサミで数 mm 程度小さくし、押し子に接着しておく)
- ゼブラ マッキープロ細字 特殊用途 DX: 1 本 (色の薄いハズレ個体がよくあるので予め確認しておく)
- 三菱アルミニウム 三菱ホイル タフ 30cm x 50m: 1 本
- ロゴス ハイパー氷点下クーラー M No.81670070: 1 個
- ロゴス 倍速凍結・氷点下パック XL No.81660640: 2 個以上 (必ず氷点下を維持できる保冷剤を使用すること)
- 大阪魂 丸ワッシャー 特寸 鉄/ユニクロ M21 x 外径 50mm x 厚さ 3.2mm 4 個入 (42175375) または 同 70 個入 (41954954): 1 枚 (予めアルミホイルで包んで乾熱滅菌しておく)
- シンワ測定 数取器 台付 75078 または 新潟精機 数取器 台付型 C-4B: 1 個

##### 必要な消耗品

- テルモ テルモシリンジ ロック付 50mL SS-50LZ: 1 本 / 1 サンプル
- 以下のいずれかの濾過フィルターユニット: 1 個 / 1 サンプル
  - Millipore Sterivex-HV 0.45µm PVDF SVHV010RS
  - Millipore Sterivex-GV 0.22µm PVDF SVGV010RS
  - Millipore Sterivex-GP 0.22µm PES SVGP01050
- 以下のいずれかの使い捨てピーカー: 1 個 / 1 サンプル
  - 大塚刷毛製造 補修用カップ 容器のみ 400mL 3221110400
  - 大塚刷毛製造 補修用カップ 容器のみ 600mL 3221110600
  - 大塚刷毛製造 補修用カップ 容器のみ 800mL 3221110800
  - ビッグ 調色ミキシングカップ 1000mL MK11L
- セイニチ ユニパック C-4: 1 枚 / 1 サンプル
- 使い捨てポリ手袋: 1 双 / 1 サンプル

##### 作業手順

1. ポリ手袋を着ける
2. ワッシャーの面が取れている方が Sterivex に接するようコーキングガン先端にセットする
3. セットしたワッシャーが何かに触れないようにコーキングガンはどこかに吊り下げる
4. 手を使わずにボタンを押せるように数取器を設置する
5. 使い捨てピーカーで必要量の水試料を量り取る

6. シリンジにビーカーから水試料 50mL を吸い取る (水に浸かるシリンジ先端 3cm 程度は触れないようにする)
7. シリンジのルアーロック部に Sterivex を取り付ける
8. コーキングガン先端のワッシャーの穴から Sterivex が突き出すようにセットする
9. Sterivex が下になるように垂直に立ててコーキングガンの引き金を引いて加圧濾過する (加圧しすぎると壊れるので、水が出るのを待つこと)
10. 50mL の濾過が終わったら、数取器のボタンを手を使わずに肘などで押してカウントアップする
11. シリンジ + Sterivex をコーキングガンから抜いて Sterivex とシリンジを分離する
12. 必要量に達するまで 6~11 を繰り返す (濾過に必要な圧力が大きくなってきたら無理せず複数本に分ける)
13. シリンジに空気をめいっぱい吸引する
14. シリンジのルアーロック部に Sterivex を取り付けてワッシャーに通す
15. Sterivex が先端から突き出すようにコーキングガンにセットする
16. Sterivex が下になるように垂直に立ててコーキングガンの引き金を引き、できるだけ Sterivex 内の水を抜く
17. シリンジ + Sterivex をコーキングガンから抜いて Sterivex とシリンジを分離する
18. 13~17 を 3 回程度繰り返して、できるだけ Sterivex 内の水を抜く
19. Sterivex をアルミホイルで包んでから、マッキープロでサンプル情報を記述したユニパックに入れ、クーラーバッグに保冷剤で挟まれるように入れる
20. ポリ手袋を外して捨てる

#### 記述しておくべきサンプル情報

- 採集地点
- 採水日時
- 濾過日時
- 濾過量
- フィルター材質
- フィルター粒子保持能

水中の粒子が少ない場合、コーキングガンを用いずに手で加圧して濾過した方が早いため、それが難しくなるくらい目詰まりするまでは手でやった方がいいでしょう。コンボイ VS では、ワッシャーを用いずにシリンジ + Sterivex をコーキングガンにセットすることも可能ですが、シリンジ + Sterivex の水に接触した部分がコーキングガンに触れないよう注意してセットする必要があります。

シリンジには 100mL タイプ (JMS JS-S00L) もあります。高価ですが、濾過作業の反復数を半減させることができます。これを用いる場合、金属製のワッシャーの代わりに、呼び径 40 の塩ビ VP 管 (内径 40.8mm・外径 48mm) を 15mm の長さに切断したものを使用します。塩ビ管は予め塩素漂白してアルミホイルで個包装しておきます。50mL シリンジとワッシャーの組み合わせでは、ワッシャーからは Sterivex だけが突き出る形になりますが、100mL シリンジと塩ビ管の組み合わせでは、Sterivex とシリンジの先端半分以上が塩ビ管から突き出るようにして、塩ビ管でフランジを支えます。なお、ここで挙げたタジマのコンボイ VS 以外のコーキングガンでは、100mL シリンジの太さには対応できない (39mm のシリンジ外筒を通せない) ものが多いのでご注意ください。

ここでは Sterivex をすぐに冷凍する方法を示しましたが、中に DNA・RNA 固定液 (作成法は付録 B.1 を参照) を注入

して両端にキャップ (テルモ テルフュージョン三方活栓キャップ密栓用 XX-WS01K\* および コクゴ 点眼キャップ赤 3 φ 101-5210102) を付けて冷凍・冷蔵・常温保管する方法もあります (DNA・RNA 固定液を注入しない場合も DNA 抽出時にはキャップを使用することになるので、採集時に付けておくのも良いでしょう)。海外などで冷凍手段が確保できない場合にはこの方法を用いることになります。



## 第2章

# DNA 抽出・ライブラリ調製・シーケンシング

### 2.1 機材・試薬の滅菌と DNA 分解によるコンタミネーションの抑制

ピペットで使用するチップは全てフィルターチップにします。ただし、DNA を含む溶液を吸わない場合にはフィルターのないチップを使っても構いません。例えば、10mL チップで DNA を含む溶液を吸うことは考えにくいので、10mL チップはフィルターなしで問題ないと思います。

使用する機材や試薬は、以下のようにいくつかの方法を用いて滅菌および DNA 分解を行うことでコンタミネーションを抑制します。

金属製機材 オープンを用いて乾熱滅菌する。250°C で 30 分。または紫外線滅菌 30 分。

ガラス製機材 オープンを用いて乾熱滅菌する。230°C で 1 時間。または紫外線滅菌 30 分。

フッ素樹脂製機材 オープンを用いて乾熱滅菌する。250°C で 30 分。または紫外線滅菌 30 分。

フェノール樹脂製機材 オープンを用いて乾熱滅菌する。200°C で 4 時間。

PBT 樹脂製機材 オープンを用いて乾熱滅菌する。180°C で 8 時間。または紫外線滅菌 30 分。

その他のプラスチック製機材 タライで塩素漂白する。20 倍希釈漂白液で 10 分。または紫外線滅菌 30 分。

乾熱滅菌、塩素漂白できない機材 DNA-OFF か DNA AWAY を染み込ませたペーパータオルで拭き取る。

試薬 ガラス瓶に入れてオートクレーブ。

クリーンベンチ 紫外線滅菌 30 分。

実験室 超音波加湿器やスプレーガンで次亜塩素酸水 (次亜塩素酸ナトリウム溶液ではない) を噴霧して燻蒸し、乾燥する。

ただし、当該処理を行うと著しく劣化したり分解する場合は行わないように注意が必要です (例えば、分解してしまうため PEG8000 を含む溶液をオートクレーブしてはいけません)。作業後の実験台やピペットは DNA-OFF か DNA AWAY を染み込ませたペーパータオルで拭き取ります (安価な次亜塩素酸水でもいいかもしれません)。作業後のプラスチック製チューブラックは塩素漂白します。恒温槽のブロックや金属製のローターは水道水で洗浄してから SPW ですすいで乾かし、紫外線を 30 分照射します。インキュベータは 250°C まで上げられるものであれば、250°C で 30 分ほど内部を乾熱滅菌します (それが可能なインキュベータを購入するようにします。「恒温乾燥器」とか「定温乾燥器」という名称で販売されています)。次亜塩素酸水を使用する場合、分解しやすいので、400ppm 以上の高濃度の品を半年以内に使い切るようにします。

遠心機は、トミー精工のMXシリーズ・MDXシリーズを用いると、プラスチック製のローターが使用できるため、塩素漂白が可能です。トミー精工MDXシリーズ用ローターTAR015-SC18と専用トレイTRA-01を使用すると、スピンの頻繁な差し替えを減らし、廃液を1本ずつ捨てる作業をなくすることができます。15mL遠沈管やザリベット、Sterivexの遠心には、トミー精工LCX-200にTS-33CスイングローターとB433バケット、3315-TC04Pラックの組み合わせ(最大16本同時遠心可能)や、久保田商事Model 4000/4200にST-2504MSスイングローターと055-1140ラックの組み合わせ(最大28本同時遠心可能)が便利です。これらの製品はラックがプラスチック製のため、塩素漂白が可能です(ただし、メーカーは推奨していない場合があります)。スイングローターを使用するのは、Sterivexの中からの排液量・残液量を均一にし、再現性を高めるためです。久保田商事Model 4200は、アングルローターRA-2724Mを用意すれば、1台でSterivexの遠心と1.5・2mLチューブ24本の遠心の両方に対応できます(プレート遠心ができるローターPT-21Mもあります)。

DNA抽出・PCR前の準備を行う部屋と、PCRおよびPCR後の操作を行う部屋は分離し、相互に行き来をしない、あるいは行き来をする場合も各部屋専用の白衣、マスク、キャップを使用するなど、PCRによる増幅後のDNAのコンタミネーションに細心の注意を払う必要があります。DNA抽出では汚れたものも扱うため、DNA抽出とPCR前の準備もできれば別の部屋に分けた方が良いでしょう。クリーンベンチを活用すれば部屋の数は減らせますが、少なくともPCR前とPCR以降で2部屋は必要です。筆者の場合、ディスクフィルターからのDNA抽出のためにフィルターを丸めてスピンのカラムに入れたりSterivexにバッファーを入れる作業、PCRの前準備をしてから鋳型としてPCR産物を加える作業、の2つだけはクリーンベンチ内で行っています(軽いものが吹き飛んだりDNAが飛び散ったりしてしまうので、作業中にファンは使用しない。なお、この2つのクリーンベンチは、異なる部屋に設置された異なるクリーンベンチです)。

## 2.2 ピペット操作と電動ピペット

あとでかく。リバースピペッティングを覚えること。

## 2.3 テクニカルレプリケートとネガティブコントロール

あとでかく。

## 2.4 DNA抽出

ここでは、自作バッファーと単体販売されているスピンのカラムを組み合わせたDNA抽出方法を説明します。既製のDNA抽出キットを用いる場合、QIAGENのDNeasy Blood & Tissue KitまたはSIGMA GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kitに置き換えることができます。バッファー類の対応関係は下記の通りです。

- Insect Lysis Buffer
  - QIAGEN Buffer ATL
  - SIGMA Lysis Solution T
- Binding Buffer

- QIAGEN Buffer AL
- SIGMA Lysis Solution C
- Wash Buffer 1
  - QIAGEN Buffer AW1
  - SIGMA Wash Solution
- Wash Buffer 2
  - QIAGEN Buffer AW2
  - SIGMA Wash Solution
- IDTE (溶出用)
  - QIAGEN Buffer AE
  - SIGMA Elution Solution

なお、SIGMA GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit では、カラム使用前に Column Preparation Solution を通す必要がありますので、忘れないようにご注意ください。

### 2.4.1 固形サンプル (濾過フィルター以外) からの DNA 抽出プロトコル

必要な試薬の作成方法は付録 B.2 を参照して下さい。

#### 必要な機材

- 恒温槽またはインキュベータ: 1 台
- 1.5/2mL チューブ 20000×g 対応遠心機: 1 台
- HOZAN ピンセット P-888: 1 本
- ライター: 1 本
- 100μL ピペット: 1 本
- 200μL ピペット: 1 本
- 1000μL ピペット: 1 本
- 10mL 電動ピペット エー・アンド・デイ MPA-10000: 1 本 (吸引吐出速度は最低に設定)

#### 必要な試薬・消耗品

- 2mL チューブ: 1 本 / 8 サンプル
- 2mL チューブ: 1 本 / 16 サンプル
- 1.5mL チューブ: 2 本 / 1 サンプル
- 1.5mL DNA 低吸着チューブ: 1 本 / 1 サンプル
- EconoSpin IIa フタあり O リングあり + 2mL 丸底チューブ EP-11201: 1 セット / 1 サンプル
- 20mg/mL Proteinase-K: 10μL / 1 サンプル
- Insect Lysis Buffer: 200μL / 1 サンプル (析出に注意)
- Binding Buffer: 200μL / 1 サンプル (析出に注意)

- Wash Buffer 1: 500 $\mu$ L / 1 サンプル
- Wash Buffer 2: 500 $\mu$ L / 1 サンプル
- 99.5% エタノール: 200 $\mu$ L / 1 サンプル
- IDTE: 120 $\mu$ L / 1 サンプル
- サンプル組織片

#### 作業手順

1. 恒温槽またはインキュベータを 56°C に設定
2. Insect Lysis Buffer、Binding Buffer を加温して析出している結晶を溶かして転倒混和
3. Wash Buffer 1・2 を冷凍庫から出して常温に戻しておく
4. 2mL チューブに Insect Lysis Buffer 200 $\mu$ L と 20mg/mL Proteinase-K 10 $\mu$ L をサンプル数倍取って転倒混和してスピンドウン (最大 8 サンプル分/チューブ)
5. サンプル組織片を用意する
6. 1.5mL チューブに仮ラベルを振って、4 を 200 $\mu$ L ずつ分注する
7. ピンセット先端を火炎滅菌する
8. 1 個だけ 6 の 1.5mL チューブの蓋を開ける
9. サンプルを 6 の 1.5mL チューブに入れる
10. 7~9 をサンプル数分繰り返す
11. 56°C で 1 時間以上インキュベートする
12. 新しい 1.5mL チューブに仮ラベルを振って、Binding Buffer 200 $\mu$ L と 99.5% エタノール 200 $\mu$ L を入れておく
13. 新しいカラムにも仮ラベルを振っておく
14. 新しい 1.5mL DNA 低吸着チューブには正式なラベルを振っておく
15. 2mL チューブに IDTE 120 $\mu$ L をサンプル数倍 + 50 $\mu$ L 分注し、56°C に加温しておく (最大 16 サンプル分/チューブ)
16. インキュベートが 1 時間経ったら、11 のチューブを 20°C6000 $\times$ g で 1 分遠心して上清を 12 のチューブに移してピペティングして、混合液 600 $\mu$ L を新しいカラムに加える
17. カラムを 20°C6000 $\times$ g で 1 分遠心して**濾液を捨てる**
18. カラムに Wash Buffer 1 を 10mL 電動ピペットで 500 $\mu$ L 加えて 20°C6000 $\times$ g で 1 分遠心し、**濾液を捨てる**
19. カラムに Wash Buffer 2 を 10mL 電動ピペットで 500 $\mu$ L 加えて 20°C20000 $\times$ g で 3 分遠心する
20. エタノールを除去するため、20°C20000 $\times$ g で更に 1 分遠心する (この濾液は捨てるが、後でよい)
21. 正式なラベルを振った 1.5mL DNA 低吸着チューブにカラムを移す (カラムに濾液が付着しないよう注意すること)
22. 15 で加温しておいた IDTE 120 $\mu$ L をカラムの中心に加え、56°C で 1 分以上インキュベート (1 サンプルごとにチップ交換)
23. 20°C6000 $\times$ g で 1 分遠心し、**濾液を回収する**
24. -20°C で保管

溶出処理の際の温度を管理することで、DNA 回収率と再現性の向上を狙っています。

17 以降の濾液の廃棄は、丸底チューブから適当な広口瓶に排液した後、アルミホイルの上にペーパータオルを引いて

丸底チューブの口をペーパータオルに押し当てて水分を吸い取らせるようにします。ペーパータオルはサンプル毎に替える必要はありませんが、コンタミネーションを防ぐためペーパータオルの使用位置は毎回ずらしします。アルミホイルの上にペーパータオルを引くのは実験台の汚れを防ぐためです。

10mL 電動ピペットで Wash Buffer を加える際、カラムからチップに跳ね返るとコンタミネーションの原因になってしまいます。そのため、カラムを立てたラックの下に適当なものを挟んでラックとカラムを傾けて、Wash Buffer をカラム内壁に斜めに当たるようにします (吐出は鉛直に行います)。電動ピペットの吐出速度も最低にセットします。こうすることで、電動ピペットを用いて迅速に Wash Buffer を加えることができます。

微生物メタゲノム DNA を抽出する場合、Proteinase-K 処理のインキュベートを一晩に延ばし、インキュベート後に凍結融解を 1~3 回繰り返します。凍結は液体窒素は用いず、-20~-80℃ の冷凍庫に 30 分~1 時間程度入れて行います (液体窒素による急速凍結では細胞が壊れにくい)。必要に応じてビーズによる破碎処理を加えることで、収量が改善することがあります。土壌サンプルなどでは、DNA 抽出にスキムミルクやその有効成分であるカゼインを加えることで収量を改善できることが知られています (Takada-Hoshino and Matsumoto, 2004; Wang *et al.*, 2012)。

#### 2.4.2 47mm ディスクフィルター (グラスファイバー) からの DNA 抽出プロトコル

必要な試薬の作成方法は付録 B.2 を参照して下さい。

##### 必要な機材

- 恒温槽またはインキュベータ: 1 台
- 1.5/2mL チューブ 20000×g 対応遠心機: 1 台
- HOZAN 逆作用ピンセット P-651: 1 本
- HOZAN ピンセット P-888: 1 本
- ライター: 1 本
- 100μL ピペット: 1 本
- 200μL ピペット: 1 本
- 1000μL ピペット: 1 本
- 10mL 電動ピペット エー・アンド・デイ MPA-10000: 1 本 (吸引吐出速度は最低に設定)

##### 必要な試薬・消耗品

- 2mL チューブ: 2 本 / 8 サンプル
- 2mL チューブ: 1 本 / 16 サンプル
- 1.5mL チューブ: 1 本 / 1 サンプル
- 1.5mL DNA 低吸着チューブ: 1 本 / 1 サンプル
- EconoSpin 空カラム フタあり + 2mL 丸底チューブ EP-31201: 1 セット / 1 サンプル
- EconoSpin IIa フタあり O リングあり + 2mL 丸底チューブ EP-11201: 1 セット / 1 サンプル
- 20mg/mL Proteinase-K: 10μL / 1 サンプル

- Insect Lysis Buffer: 200 $\mu$ L / 1 サンプル (析出に注意)
- Binding Buffer: 400 $\mu$ L / 1 サンプル (析出に注意)
- Wash Buffer 1: 500 $\mu$ L / 1 サンプル
- Wash Buffer 2: 500 $\mu$ L / 1 サンプル
- 99.5% エタノール: 400 $\mu$ L / 1 サンプル
- IDTE: 200 $\mu$ L / 1 サンプル
- IDTE: 120 $\mu$ L / 1 サンプル
- 47mm ディスクフィルターサンプル

### 作業手順

1. 恒温槽またはインキュベータを 56°C に設定
2. Insect Lysis Buffer、Binding Buffer を加温して析出している結晶を溶かして転倒混和
3. Wash Buffer 1・2 を冷凍庫から出して常温に戻しておく
4. 2mL チューブに Insect Lysis Buffer 200 $\mu$ L と 20mg/mL Proteinase-K 10 $\mu$ L をサンプル数倍取って転倒混和してスピンドウン (最大 8 サンプル分/チューブ)
5. 2mL チューブに IDTE 200 $\mu$ L をサンプル数倍 + 50 $\mu$ L 分注し、56°C に加温しておく (最大 8 サンプル分/チューブ)
6. ディスクフィルターを解凍する
7. 空カラムに仮ラベルを振っておく
8. 2 本のピンセット先端を火炎滅菌する
9. 1 個だけ空カラムの蓋を開ける
10. フィルターを二つ折りのまま、折り目をピンセット先端側にして両端をそれぞれ掴む
11. 先端ストレートの逆作用ピンセットを回転させてフィルターを筒状に丸める
12. 丸めたフィルターの折り目が下になるように空カラムに突っ込んで、平たいピンセットを外す
13. 空カラム側を回転させながら丸めたフィルターを奥まで突っ込む
14. 平たいピンセットでフィルターを押さえ、先端ストレートの逆作用ピンセットを抜き取る
15. 平たいピンセットでフィルターを空カラムにしっかり押し込む
16. 8~15 をサンプル数分繰り返す (ただし、4 サンプル溜まったら 17~18 を行う)
17. 空カラムのフタを閉じ、20°C20000 $\times$ g で 1 分遠心してフィルターの水を切って**濾液を捨てる**
18. 空カラムに 4 をフィルターの上から 200 $\mu$ L 加える (1 サンプルごとにチップ交換)
19. 56°C で 1 時間以上インキュベートする
20. 新しい 1.5mL チューブに仮ラベルを振って、Binding Buffer 400 $\mu$ L と 99.5% エタノール 400 $\mu$ L を入れておく
21. 新しいカラムにも仮ラベルを振っておく
22. 新しい 1.5mL DNA 低吸着チューブには正式なラベルを振っておく
23. 2mL チューブに IDTE 120 $\mu$ L をサンプル数倍 + 50 $\mu$ L 分注し、56°C に加温しておく (最大 16 サンプル分/チューブ)
24. インキュベータが 1 時間経ったら、19 の空カラムを 20°C6000 $\times$ g で 1 分遠心して**濾液はそのままにする**
25. 空カラムに 5 の加温しておいた IDTE 200 $\mu$ L をフィルターの上から加え、56°C で 1 分以上インキュベート (1 サンプルごとにチップ交換)
26. 空カラムを 20°C20000 $\times$ g で 1 分遠心し、**濾液を 20 のチューブに移して**ピペッティングして、混合液 600 $\mu$ L を新しいカラムに加える

27. カラムを 20°C6000×g で 1 分遠心して**濾液を捨てる**
28. 26 のチューブから残りの混合液をカラムに加える
29. カラムを 20°C6000×g で 1 分遠心して**濾液を捨てる**
30. カラムに Wash Buffer 1 を 10mL 電動ピペットで 500μL 加えて 20°C6000×g で 1 分遠心し、**濾液を捨てる**
31. カラムに Wash Buffer 2 を 10mL 電動ピペットで 500μL 加えて 20°C20000×g で 3 分遠心する
32. エタノールを除去するため、20°C20000×g で更に 1 分遠心する (この濾液は捨てるが、後でよい)
33. 正式なラベルを振った 1.5mL DNA 低吸着チューブにカラムを移す (カラムに濾液が付着しないよう注意すること)
34. 20 で加温しておいた IDTE 120μL をカラムの中心に加え、56°C で 1 分以上インキュベート (1 サンプルごとにチップ交換)
35. 20°C6000×g で 1 分遠心し、**濾液を回収する**
36. -20°C で保管

溶出処理の際の温度を管理することで、DNA 回収率と再現性の向上を狙っています。

27 以降の濾液の廃棄は、丸底チューブから適当な広口瓶に排液した後、アルミホイルの上にペーパータオルを引いて丸底チューブの口をペーパータオルに押し当てて水分を吸い取らせるようにします。ペーパータオルはサンプル毎に替える必要はありませんが、コンタミネーションを防ぐためペーパータオルの使用位置は毎回ずらしします。アルミホイルの上にペーパータオルを引くのは実験台の汚れを防ぐためです。

10mL 電動ピペットで Wash Buffer を加える際、カラムからチップに跳ね返るとコンタミネーションの原因になってしまいます。そのため、カラムを立てたラックの下に適当なものを挟んでラックとカラムを傾けて、Wash Buffer をカラム内壁に斜めに当たるようにします (吐出は鉛直に行います)。電動ピペットの吐出速度も最低にセットします。こうすることで、電動ピペットを用いて迅速に Wash Buffer を加えることができます。

グラスファイバーは Binding Buffer があると DNA を吸着するかもしれないので、Insect Lysis Buffer と IDTE によってフィルターから DNA を溶出しています。ただ、エタノールがなければ (疎水的な環境でなければ) 吸着はしないかもしれませんが (試していないので不明)。カラムに 2 回に分けて DNA を吸着させるのが面倒であれば、IDTE の代わりに Binding Buffer をフィルターに通して DNA を溶出できるかどうか試してみてもいいかもしれません。

環境 DNA ではなく微生物メタゲノム DNA を抽出する場合、Proteinase-K 処理のインキュベートを一晩に延ばし、インキュベート後に凍結融解を 1~3 回繰り返します。凍結は液体窒素は用いず、-20~-80°C の冷凍庫に 30 分~1 時間程度入れて行います (液体窒素による急速凍結では細胞が壊れにくい)。また、微生物メタゲノム DNA を抽出する場合、ビーズを用いた破碎処理を加えたいことがあります。そのような場合、フィルターを水抜き後に滅菌したアイリス剪刀でバッファー中で切り刻み、ビーズを加えて破碎処理を行いますが、グラスファイバーフィルターは向いていないので、他のフィルターを用いるようにして下さい。

### 2.4.3 47mm ディスクフィルター (ポリカーボネート・PVDF・PES) からの DNA 抽出プロトコル

必要な試薬の作成方法は付録 B.2 を参照して下さい。

### 必要な機材

- 恒温槽またはインキュベータ: 1 台
- 1.5/2mL チューブ 20000×g 対応遠心機: 1 台
- HOZAN 逆作用ピンセット P-651: 1 本
- HOZAN ピンセット P-888: 1 本
- ライター: 1 本
- 100μL ピペット: 1 本
- 200μL ピペット: 1 本
- 1000μL ピペット: 1 本
- エー・アンド・デイ 10mL 電動ピペット MPA-10000: 1 本 (吸引吐出速度は最低に設定)

### 必要な試薬・消耗品

- 2mL チューブ: 2 本 / 8 サンプル
- 2mL チューブ: 1 本 / 16 サンプル
- 1.5mL チューブ: 1 本 / 1 サンプル
- 1.5mL DNA 低吸着チューブ: 1 本 / 1 サンプル
- EconoSpin 空カラム フタあり + 2mL 丸底チューブ EP-31201: 1 セット / 1 サンプル
- EconoSpin IIa フタあり O リングあり + 2mL 丸底チューブ EP-11201: 1 セット / 1 サンプル
- 20mg/mL Proteinase-K: 10μL / 1 サンプル
- Insect Lysis Buffer: 200μL / 1 サンプル (析出に注意)
- Binding Buffer: 200μL / 1 サンプル (析出に注意)
- Wash Buffer 1: 500μL / 1 サンプル
- Wash Buffer 2: 500μL / 1 サンプル
- 99.5% エタノール: 200μL / 1 サンプル
- IDTE: 120μL / 1 サンプル
- 47mm ディスクフィルターサンプル

### 作業手順

1. 恒温槽またはインキュベータを 56°C に設定
2. Insect Lysis Buffer、Binding Buffer を加温して析出している結晶を溶かして転倒混和
3. Wash Buffer 1・2 を冷凍庫から出して常温に戻しておく
4. 2mL チューブに Insect Lysis Buffer 200μL と 20mg/mL Proteinase-K 10μL をサンプル数倍取って転倒混和してスピンドウン (最大 8 サンプル分/チューブ)
5. 2mL チューブに Binding Buffer 200μL をサンプル数倍 + 50μL 分注し、56°C に加温しておく (最大 8 サンプル分/チューブ)
6. ディスクフィルターを解凍する



7. 空カラムに仮ラベルを振っておく
8. 2本のピンセット先端を火炎滅菌する
9. 1個だけ空カラムの蓋を開ける
10. フィルターを二つ折りのまま、折り目をピンセット先端側にして両端をそれぞれ掴む
11. 先端ストレートの逆作用ピンセットを回転させてフィルターを筒状に丸める
12. 丸めたフィルターの折り目が下になるように空カラムに突っ込んで、平たいピンセットを外す
13. 空カラム側を回転させながら丸めたフィルターを奥まで突っ込む
14. 平たいピンセットでフィルターを押さえ、先端ストレートの逆作用ピンセットを抜き取る
15. 平たいピンセットでフィルターを空カラムにしっかり押し込む
16. 8~15をサンプル数分繰り返す(ただし、4サンプル溜まったら17~18を行う)
17. 空カラムのフタを閉じ、20°C20000×gで1分遠心してフィルターの水を切って**濾液を捨てる**
18. 空カラムに4をフィルターの上から200μL加える(1サンプルごとにチップ交換)
19. 56°Cで1時間以上インキュベートする
20. 新しい1.5mLチューブに仮ラベルを振って、99.5%エタノール200μLを入れておく
21. 新しいカラムにも仮ラベルを振っておく
22. 新しい1.5mL DNA 低吸着チューブには正式なラベルを振っておく
23. 2mLチューブにIDTE 120μLをサンプル数倍+ 50μL分注し、56°Cに加温しておく(最大16サンプル分/チューブ)
24. インキュベートが1時間経ったら、19の空カラムを20°C6000×gで1分遠心して**濾液はそのままにする**
25. 空カラムに5の加温しておいたBinding Buffer 200μLをフィルターの上から加え、56°Cで1分以上インキュベート(1サンプルごとにチップ交換)
26. 空カラムを20°C20000×gで1分遠心し、**濾液を20のチューブに移して**ピペティングして、混合液600μLを新しいカラムに加える
27. カラムを20°C6000×gで1分遠心して**濾液を捨てる**
28. カラムにWash Buffer 1を10mL電動ピペットで500μL加えて20°C6000×gで1分遠心し、**濾液を捨てる**
29. カラムにWash Buffer 2を500μL加えて20°C20000×gで3分遠心する
30. エタノールを除去するため、20°C20000×gで更に1分遠心する(この濾液は捨てるが、後でよい)
31. 正式なラベルを振った1.5mL DNA 低吸着チューブにカラムを移す(カラムに濾液が付着しないよう注意すること)
32. 20で加温しておいたIDTE 120μLをカラムの中心に加え、56°Cで1分以上インキュベート(1サンプルごとにチップ交換)
33. 20°C6000×gで1分遠心し、**濾液を回収する**
34. -20°Cで保管

溶出処理の際の温度を管理することで、DNA回収率と再現性の向上を狙っています。

27以降の濾液の廃棄は、丸底チューブから適当な広口瓶に排液した後、アルミホイルの上にペーパータオルを引いて丸底チューブの口をペーパータオルに押し当てて水分を吸い取らせるようにします。ペーパータオルはサンプル毎に替える必要はありませんが、コンタミネーションを防ぐためペーパータオルの使用位置は毎回ずらします。アルミホイルの上にペーパータオルを引くのは実験台の汚れを防ぐためです。

10mL電動ピペットでWash Bufferを加える際、カラムからチップに跳ね返るとコンタミネーションの原因になってし

まいます。そのため、カラムを立てたラックの下に適当なものを挟んでラックとカラムを傾けて、Wash Buffer をカラム内壁に斜めに当たるようにします(吐出は鉛直に行います)。電動ピペットの吐出速度も最低にセットします。こうすることで、電動ピペットを用いて迅速に Wash Buffer を加えることができます。

ポリカーボネート・PVDF・PES 製フィルターは、Binding Buffer があっても DNA を吸着しないはずなので、IDTE で追加の溶出を行う必要がありません。そのため、ここでは IDTE を用いずに Binding Buffer を用いてフィルターから DNA を溶出しています。これにより、カラムに DNA を吸着させる操作が1回で済むようになっています。セルロース混合エステル製フィルターの場合にどちらがいいのかは把握していません。いずれにしろ、グラスファイバーフィルター用のプロトコルでやっておけば手間は多いですが間違いはありません。手間を減らしたい場合はこちらのプロトコルを検討してみるといいでしょう。

環境 DNA ではなく微生物メタゲノム DNA を抽出する場合、Proteinase-K 処理のインキュベートを一晩に延ばし、インキュベート後に凍結融解を1〜3回繰り返します。凍結は液体窒素は用いず、-20〜-80℃の冷凍庫に30分〜1時間程度入れて行います(液体窒素による急速凍結では細胞が壊れにくい)。また、微生物メタゲノム DNA を抽出する場合、ビーズを用いた破碎処理を加えたいことがあります。そのような場合、フィルターを水抜き後に滅菌したアイリス剪刀でバッファー中で切り刻み、ビーズを加えて破碎処理を行います。

#### 2.4.4 Sterivex 水抜きサンプルからの DNA 抽出プロトコル

必要な試薬の作成方法は付録 B.2 を参照して下さい。

##### 必要な機材

- 恒温槽またはインキュベーター: 1 台
- 1.5/2mL チューブ 20000×g 対応遠心機: 1 台
- 15mL 遠沈管 4000×g 対応スイングロータ遠心機: 1 台
- アズワン ミニローテーター ACR-100 2-922-01: 1 台
- 100μL ピペット: 1 本
- 200μL ピペット: 1 本
- 1000μL ピペット: 1 本
- 10mL 電動ピペット エー・アンド・デイ MPA-10000: 1 本(吸引吐出速度は最低に設定)

##### 必要な試薬・消耗品

- 3mL 丸底テストチューブ: 2 本 / 1 サンプル
- 2mL チューブ: 1 本 / 4 サンプル
- 2mL チューブ: 1 本 / 16 サンプル
- 1.5mL チューブ: 1 本 / 1 サンプル
- 1.5mL DNA 低吸着チューブ: 1 本 / 1 サンプル
- EconoSpin IIa フタあり O リングあり + 2mL 丸底チューブ EP-11201: 1 セット / 1 サンプル

- 20mg/mL Proteinase-K: 10 $\mu$ L / 1 サンプル
- Insect Lysis Buffer: 215 $\mu$ L / 1 サンプル (析出に注意)
- Binding Buffer: 200 $\mu$ L / 1 サンプル (析出に注意)
- Wash Buffer 1: 500 $\mu$ L / 1 サンプル
- Wash Buffer 2: 500 $\mu$ L / 1 サンプル
- 99.5% エタノール: 400 $\mu$ L / 1 サンプル
- IDTE: 120 $\mu$ L / 1 サンプル
- テルモ テルフュージョン三方活栓密栓用キャップ XX-WS01K\* (入口側キャップ): 1 個 / 1 サンプル
- コクゴ 点眼キャップ 赤 3  $\phi$  101-5210102 (出口側キャップ): 1 個 / 1 サンプル
- 3M トランスポア サージカルテープ 25mm 幅 1527-1: 1 本
- Sterivex 水抜きサンプル

#### 作業手順

1. 恒温槽またはインキュベータを 56°C に設定
2. Insect Lysis Buffer、Binding Buffer を加温して析出している結晶を溶かして転倒混和
3. Wash Buffer 1・2 を冷凍庫から出して常温に戻しておく
4. 2mL チューブに Binding Buffer 200 $\mu$ L、Insect Lysis Buffer 215 $\mu$ L と 20mg/mL Proteinase-K 10 $\mu$ L をサンプル数倍取って転倒混和してスピンドウン (最大 4 サンプル分/チューブ)
5. Sterivex の**出口側**にキャップを取り付け、**入口側**に 3mL 丸底テストチューブをサージカルテープで固定する
6. 15mL 遠沈管対応のローターに Sterivex とチューブを差し込み、20°C4000 $\times$ g で 2 分間遠心して水抜きする (ローターに入らない場合はテープを貼り直す)
7. 3mL 丸底テストチューブを Sterivex から外して捨てる
8. Sterivex の入口側から 4 の混合液 420 $\mu$ L を 1000 $\mu$ L ロングチップで注入する (太いチップでは入れられないので注意)
9. Sterivex の入口側にもキャップを取り付け、ローターにセットして 10rpm で回転させながら 56°C で 1 時間以上インキュベートする
10. 新しい 3mL 丸底テストチューブに仮ラベルを振っておく
11. 新しいカラムにも仮ラベルを振っておく
12. 新しい 1.5mL チューブに仮ラベルを振って、99.5% エタノール 200 $\mu$ L を入れておく
13. 新しい 1.5mL DNA 低吸着チューブには正式なラベルを振っておく
14. 2mL チューブに IDTE 120 $\mu$ L をサンプル数倍 + 50 $\mu$ L 分注し、56°C に加温しておく (最大 16 サンプル分/チューブ)
15. インキュベーターが 1 時間経ったら、Sterivex の**入口側**キャップを外し、**入口側**に 3mL 丸底テストチューブをサージカルテープで固定する
16. Sterivex + 3mL 丸底テストチューブを 20°C4000 $\times$ g で 2 分間遠心して**濾液を回収する**
17. **濾液を 12 のチューブに移して**ピペティングして、混合液 600 $\mu$ L (少し多くても 700 $\mu$ L 未満なら全部取る。700 $\mu$ L 以上なら複数回に分けて濾過する) を新しいカラムに加える
18. カラムを 20°C6000 $\times$ g で 1 分遠心して**濾液を捨てる**
19. カラムに Wash Buffer 1 を 10mL 電動ピペットで 500 $\mu$ L 加えて 20°C6000 $\times$ g で 1 分遠心し、**濾液を捨てる**
20. カラムに Wash Buffer 2 を 10mL 電動ピペットで 500 $\mu$ L 加えて 20°C20000 $\times$ g で 3 分遠心する

21. エタノールを除去するため、20°C20000×g で更に 1 分遠心する (この濾液は捨てるが、後でよい)
22. 正式なラベルを振った 1.5mL DNA 低吸着チューブにカラムを移す (カラムに濾液が付着しないよう注意すること)
23. 14 で加温しておいた IDTE 120μL をカラムの中心に加え、56°C で 1 分以上インキュベート (1 サンプルごとにチップ交換)
24. 20°C6000×g で 1 分遠心し、**濾液を回収する**
25. -20°C で保管

溶出処理の際の温度を管理することで、DNA 回収率と再現性の向上を狙っています。

サージカルテープの汚れ防止、カット補助にメディディア社のサージカルテープカッター「きるる」の使用を推奨します。

18 以降の濾液の廃棄は、丸底チューブから適当な広口瓶に排液した後、アルミホイルの上にペーパータオルを引いて丸底チューブの口をペーパータオルに押し当てて水分を吸い取らせるようにします。ペーパータオルはサンプル毎に替える必要はありませんが、コンタミネーションを防ぐためペーパータオルの使用位置は毎回ずらしします。アルミホイルの上にペーパータオルを引くのは実験台の汚れを防ぐためです。

10mL 電動ピペットで Wash Buffer を加える際、カラムからチップに跳ね返るとコンタミネーションの原因になってしまいます。そのため、カラムを立てたラックの下に適当なものを挟んでラックとカラムを傾けて、Wash Buffer をカラム内壁に斜めに当たるようにします (吐出は鉛直に行います)。電動ピペットの吐出速度も最低にセットします。こうすることで、電動ピペットを用いて迅速に Wash Buffer を加えることができます。

Sterivex 内の水抜きの際、しっかり水が除去できるように入口側から排液するようにしていますが、DNA のロスが心配であれば出口側から排液しても構いません (水抜きサンプルではフィルター上にしっかり付いているから問題ないと考えています。ただ、遠心はもう少し弱くした方がいいかもしれません)。ただし、排液が出口側の場合、内部に 200μL 近い水が残留します (遠心機にもよるので、事前にテスト用 Sterivex で残留量を計測しておく) ので、Insect Lysis Buffer を使用せずに Binding Buffer 200μL と 20mg/mL Proteinase-K 20μL だけを Sterivex に注入してインキュベートして下さい。

Sterivex のフィルターは、Binding Buffer があっても DNA を吸着しないはずなので、ここでは IDTE を用いずに Binding Buffer を用いてフィルターから DNA を溶出しています。これにより、カラムに DNA を吸着させる操作が 1 回で済むようになっています。

環境 DNA ではなく微生物メタゲノム DNA を抽出する場合、Proteinase-K 処理のインキュベートを一晩に延ばし、インキュベート後に凍結融解を 1~3 回繰り返します。凍結は液体窒素は用いず、-20~-80°C の冷凍庫に 30 分~1 時間程度入れて行います (液体窒素による急速凍結では細胞が壊れにくい)。また、微生物メタゲノム DNA を抽出する場合、ビーズを用いた破砕処理を加えたいことがあります。そのような場合、0.5mm 径ジルコニアビーズを Sterivex 中に入れてボルテックスを行います (Ushio, 2019)。ビーズ破砕処理を行う場合、フィルター表面に付着した細胞を遊離させるため、Insect Lysis Buffer の代わりに PBS (-) などを用いた方がよいでしょう。

### 2.4.5 Sterivex 固定液入サンプルからの DNA 抽出プロトコル

必要な試薬の作成方法は付録 B.2 を参照して下さい。

#### 必要な機材

- 恒温槽またはインキュベータ: 1 台
- 1.5/2mL チューブ 20000×g 対応遠心機: 1 台
- 15mL 遠沈管 4000×g 対応スイングロータ遠心機: 1 台
- アズワン ミニローテーター ACR-100 2-922-01: 1 台
- 100μL ピペット: 1 本
- 200μL ピペット: 1 本
- 1000μL ピペット: 1 本
- 10mL 電動ピペット エー・アンド・デイ MPA-10000: 1 本 (吸引吐出速度は最低に設定)

#### 必要な試薬・消耗品

- 3mL 丸底テストチューブ: 2 本 / 1 サンプル
- 2mL チューブ: 1 本 / 8 サンプル
- 2mL チューブ: 1 本 / 16 サンプル
- 1.5mL チューブ: 1 本 / 1 サンプル
- 1.5mL DNA 低吸着チューブ: 1 本 / 1 サンプル
- EconoSpin IIa フタあり O リングあり + 2mL 丸底チューブ EP-11201: 1 セット / 1 サンプル
- 20mg/mL Proteinase-K: 10μL / 1 サンプル
- Binding Buffer: 215μL / 1 サンプル (析出に注意)
- Wash Buffer 1: 500μL / 1 サンプル
- Wash Buffer 2: 500μL / 1 サンプル
- 99.5% エタノール: 400μL / 1 サンプル
- IDTE: 120μL / 1 サンプル
- IDTE: 2mL / 1 サンプル
- 3M トランスポア サージカルテープ 25mm 幅 1527-1: 1 本
- Sterivex 固定液入サンプル (両端キャップ付き)

#### 作業手順

1. 恒温槽またはインキュベータを 56°C に設定
2. Binding Buffer を加温して析出している結晶を溶かして転倒混和
3. Wash Buffer 1・2 を冷凍庫から出して常温に戻しておく

4. 2mL チューブに Binding Buffer 215 $\mu$ L、20mg/mL Proteinase-K 10 $\mu$ L をサンプル数倍取って転倒混和してスピンドウン (最大 8 サンプル分/チューブ)
5. Sterivex の**出口側**キャップを外し (キャップは再利用するので、サンプル間で取り違えないよう注意してとっておく)、**出口側に** 3mL 丸底テストチューブをサージカルテープで固定する
6. 15mL 遠沈管対応のローターに Sterivex とチューブを差し込み、20°C4000 $\times$ g で 2 分間遠心して固定液を排液する (ローターに入らない場合はテープを貼り直す)
7. 3mL 丸底テストチューブを Sterivex から外して排液を捨て、再度 3mL 丸底テストチューブをサージカルテープで固定する
8. Sterivex の入口側キャップを外し、IDTE 1mL を 1000 $\mu$ L ロングチップで注入する (太いチップでは入れられないので注意)
9. Sterivex の入口側キャップを取り付け、20°C4000 $\times$ g で 2 分間遠心して排液する
10. 8~9 を再度繰り返す
11. この時点で十分に薄まった固定液が Sterivex 内に 200 $\mu$ L 近く入っている (遠心機にもよるので、事前にテスト用 Sterivex で残留量を計測しておく)
12. 3mL 丸底テストチューブを Sterivex から外して排液を捨て、出口側に再度キャップをする
13. Sterivex の入口側キャップを外し、4 の混合液 220 $\mu$ L を 1000 $\mu$ L ロングチップで注入する (太いチップでは入れられないので注意)
14. Sterivex の入口側キャップを取り付け、ローターにセットして 10rpm で回転させながら 56°C で 1 時間以上インキュベートする
15. 新しい 3mL 丸底テストチューブに仮ラベルを振っておく
16. 新しいカラムにも仮ラベルを振っておく
17. 新しい 1.5mL チューブに仮ラベルを振って、99.5% エタノール 200 $\mu$ L を入れておく
18. 新しい 1.5mL DNA 低吸着チューブには正式なラベルを振っておく
19. 2mL チューブに IDTE 120 $\mu$ L をサンプル数倍 + 50 $\mu$ L 分注し、56°C に加温しておく (最大 16 サンプル分/チューブ)
20. インキュベートが 1 時間経ったら、Sterivex の**入口側**キャップを外し、**入口側に** 3mL 丸底テストチューブをサージカルテープで固定する
21. Sterivex + 3mL 丸底テストチューブを 20°C4000 $\times$ g で 2 分間遠心して**濾液を回収する**
22. **濾液を 17 のチューブに移して**ピペッティングして、混合液 600 $\mu$ L (少し多くても 700 $\mu$ L 未満なら全部取る。700 $\mu$ L 以上なら複数回に分けて濾過する) を新しいカラムに加える
23. カラムを 20°C6000 $\times$ g で 1 分遠心して**濾液を捨てる**
24. カラムに Wash Buffer 1 を 10mL 電動ピペットで 500 $\mu$ L 加えて 20°C6000 $\times$ g で 1 分遠心し、**濾液を捨てる**
25. カラムに Wash Buffer 2 を 10mL 電動ピペットで 500 $\mu$ L 加えて 20°C20000 $\times$ g で 3 分遠心する
26. エタノールを除去するため、20°C20000 $\times$ g で更に 1 分遠心する (この濾液は捨てるが、後でよい)
27. 正式なラベルを振った 1.5mL DNA 低吸着チューブにカラムを移す (カラムに濾液が付着しないよう注意すること)
28. 19 で加温しておいた IDTE 120 $\mu$ L をカラムの中心に加え、56°C で 1 分以上インキュベート (1 サンプルごとにチップ交換)
29. 20°C6000 $\times$ g で 1 分遠心し、**濾液を回収する**
30. -20°C で保管

溶出処理の際の温度を管理することで、DNA 回収率と再現性の向上を狙っています。

サージカルテープの汚れ防止、カット補助にメディディア社のサージカルテープカッター「きるる」の使用を推奨します。

23 以降の濾液の廃棄は、丸底チューブから適当な広口瓶に排液した後、アルミホイルの上にペーパータオルを引いて丸底チューブの口をペーパータオルに押し当てて水分を吸い取らせるようにします。ペーパータオルはサンプル毎に替える必要はありませんが、コンタミネーションを防ぐためペーパータオルの使用位置は毎回ずらしします。アルミホイルの上にペーパータオルを引くのは実験台の汚れを防ぐためです。

10mL 電動ピペットで Wash Buffer を加える際、カラムからチップに跳ね返るとコンタミネーションの原因になってしまいます。そのため、カラムを立てたラックの下に適当なものを挟んでラックとカラムを傾けて、Wash Buffer をカラム内壁に斜めに当たるようにします (吐出は鉛直に行います)。電動ピペットの吐出速度も最低にセットします。こうすることで、電動ピペットを用いて迅速に Wash Buffer を加えることができます。

Sterivex のフィルターは、Binding Buffer があっても DNA を吸着しないはずなので、ここでは IDTE を用いずに Binding Buffer を用いてフィルターから DNA を溶出しています。これにより、カラムに DNA を吸着させる操作が 1 回で済むようになっています。

環境 DNA ではなく微生物メタゲノム DNA を抽出する場合、Proteinase-K 処理のインキュベートを一晩に延ばし、インキュベート後に凍結融解を 1~3 回繰り返します。凍結は液体窒素は用いず、-20~-80℃ の冷凍庫に 30 分~1 時間程度入れて行います (液体窒素による急速凍結では細胞が壊れにくい)。また、微生物メタゲノム DNA を抽出する場合、ビーズを用いた破碎処理を加えたいことがあります。そのような場合、0.5mm 径ジルコニアビーズを Sterivex 中に入れてボルテックスを行います (Ushio, 2019)。ビーズ破碎処理を行う場合、フィルター表面に付着した細胞を遊離させるため、IDTE の代わりに PBS (-) などを用いた方がよいでしょう。

#### 2.4.6 磁気ビーズを用いた DNA の精製プロトコル

抽出した DNA をそのまま用いると、サンプルによっては増幅阻害物質によって PCR がうまくいかないことがあります。そのような場合、この処理を加えることでうまくいくようになる場合があります。ただし、実際にはサンプルが多い場合は非常に手間がかかるので、筆者はこの方法はほとんど使用していません。磁気ビーズアッセイに対応したプレートウォッシャー (TECAN HydroSpeed 等) をお持ちの場合、機械任せにできるので大量のサンプルにも適用できると思います。

##### 必要な機材

- 1.5mL または 2mL チューブ用磁気スタンド: 1 台 (強力なネオジム磁石があれば、チューブラックの横に貼る程度でよい)
- 10mL 電動ピペット エー・アンド・デイ MPA-10000: 1 本 (吸引吐出速度は最低に設定)

### 必要な試薬・消耗品

- 1.5mL チューブ: 1 本
- 1.5mL DNA 低吸着チューブ: 1 本
- MagNA 液 (作成方法は付録 B.4 を参照): 100 $\mu$ L
- サンプル DNA 溶液: 100 $\mu$ L
- IDTE: 100 $\mu$ L
- 70% エタノール: 1800 $\mu$ L

### 作業手順

1. MagNA 液を 30 分程度放置して室温に戻す
2. 新しい 1.5mL チューブ、新しい 1.5mL DNA 低吸着チューブにラベルを振っておく
3. MagNA 液を転倒混和して磁気ビーズを均一にする
4. 1.5mL チューブにサンプル DNA 溶液と等量の MagNA 液を分注する
5. サンプル DNA 溶液を 3 のチューブに加えてピペッティングする
6. 磁気スタンドに立てて 5 分待つ
7. 上澄みを吸い取って捨てる
8. 磁気スタンドに立てたまま 10mL 電動ピペットで 70% エタノール 900 $\mu$ L を加える
9. エタノールを吸い取って捨てる
10. 磁気スタンドに立てたまま 10mL 電動ピペットで 70% エタノール 900 $\mu$ L を加える
11. エタノールを吸い取って捨てる (できるだけ除去)
12. 磁気スタンドからチューブを外して 20°C で 3 分インキュベート (磁気ビーズを適度に乾かす。乾かしすぎるとビーズが割れて回収率低下するので注意)
13. 元のサンプル DNA 溶液と等量の IDTE を加えてボルテックスして DNA を溶出させる
14. 磁気スタンドに立てて 5 分待つ
15. 溶液を新しい 1.5mL DNA 低吸着チューブに移す

## 2.5 ライブラリ調製

### 2.5.1 チューブ・96 ウェルプレート・プレートシール・サーマルサイクラー・電動ピペットについて

ライブラリ調製では、8 連の 0.2mL チューブと 96 ウェルプレートを多用します。8 連チューブは、キャップ付きで個別に開閉できるものを使用します。8 連チューブの代わりにシングル 0.2mL チューブを使用しても構いません。96 ウェルプレートは使いやすいもので構いませんが、縁が盛り上がっていないタイプ (ウェルの縁ではなくプレートの縁です) の方がプレートシールをしっかりと貼りやすいので、縁が盛り上がっているタイプは避けた方が無難です。



プレートシールは、スリオンテック No. 8160 アルミテープ (ツヤあり) というアルミロールテープを筆者は使用しています。専用のプレートシールに比べてはるかに安価で、一時的に貼るような用途にも気楽に使えますし、しっかり貼り付くので長期保管も問題ありません。少し厚めなので、シールアPLICレーターを強く押し付けても簡単には破れません。ただし、PCR に使用すると、PCR 後は剥がれやすくなっているので、新品に交換するようにします。

サーマルサイクラーは、96 ウェルプレート対応であってもプレートシールに対応しておらずキャップをしなくてはならないものがあり、無理にプレートシールを使うと蒸気漏れでコンタミネーションを起こしてしまうことがあります。蒸気漏れの際はブロックやヒートリッドなどを DNA-OFF か DNA AWAY で洗浄し、さらに SPW ですすぐ必要があります。サーマルサイクラーを購入の際はデモ機を取り寄せるなどして、ご使用の 96 ウェルプレートとプレートシールで蒸気漏れが起きないことをしっかりと確認して下さい。確認は、プレートの全ウェルに SPW 10~15 $\mu$ L を分注し、よく使用する PCR プログラムを走らせて完了後にスピンドウンし、前後の SPW の容量変化を見ればいいでしょう。迷ったときは Applied Biosystems の新し目の機種にしておけば間違いはないです。他社より少し高いですが、キャップを使うよりもはるかにランニングコストが安いので、すぐに元は取れます。蒸気漏れしづらく、PCR 後の側面への結露量も非常に少ないので、大変おすすめです。故障の際は海外での修理になるので時間がかかりますが、通常は代替品を貸してもらえはるはず。筆者の手持ちのサーマルサイクラー (TaKaRa Thermal Cycler Dice Touch) では、日本ジェネティクス FG-1702 と SSibio UltraFlux Sealing Mats 3510-00 (日本ではアズワン、イナ・オプティカ、フナコシなどが取り扱っています) の組み合わせで蒸気漏れなく PCR 可能であることを確認しています (ただし側壁への結露が多いのであまりおすすめではありません)。この組み合わせでの PCR の際、Bio-Rad リアルタイム PCR 用コンプレッションパッド #ADR3296 を挟むことで、ヒートリッドからの熱伝導が改善し、側壁への結露が改善します。シリコンシーリングマットは、塩素漂白して SPW で洗浄することで繰り返し使用可能です。ただし、保管時のシールには向きませんので、保管にはスリオンテック No. 8160 を使用します。

ライブラリ調製では電動ピペットも多用します。シングルの電動ピペットはエー・アンド・デイの MPA シリーズやアイカムス・ラボの Pipetty シリーズなど、大変安価なものが出ており、十分使い物になります。マルチチャンネルの電動ピペットはあまり多くのメーカーから出ていませんが、100 $\mu$ L サイズ 12 連の Eppendorf Xplorer Plus や Sartorius Picus など、「等量連続吸引」に対応した機種を持っておくと、96 ウェルプレート上の 8 レプリケートの PCR 産物 12 サンプル分を一気にまとめることができ、効率的に作業できます。また、インデックス配列付きプライマーを使用する際にも、10 $\mu$ L サイズ 12 連の Eppendorf Xplorer (分注だけなら Plus である必要はない) や Sartorius Picus があると便利です。

さらに大量のサンプルを迅速に処理したい場合、384 ウェルプレートの使用も視野に入れた方がよいでしょう。この場合、サーマルサイクラーも専用のものが必要になります。384 ウェルプレートは大変穴が小さく、手作業では分注ミスが頻発しますので、Gilson Trackman などの LED を用いた補助器具、Gilson Platemaster や Eppendorf epMotion 96 などの 96 連ピペット、FORMULATRIX MANTIS などの自動分注ロボットの導入も考慮すべきだと思います。気合で何とかすることもできなくはありませんが、学生やパートの実験補助員に要求するのは酷でしょう。

## 2.5.2 プライマーの設計と発注の方法

Illumina のシーケンサーでマルチプレックスする場合、アダプター配列付きプライマーで PCR を行うことで、PCR 産物にアダプター配列を付加しておき、そのアダプター配列をターゲットとするインデックス配列付きプライマーを使用してさらに PCR を行うことでライブラリを作成します。少なくとも 2 段階の PCR を行う必要があるわけですが、最初にアダプター配列なしのプライマーでの PCR をしておく方法もあり、その場合は 3 段階の PCR を行うことになります。2 段階でも 3 段階でも構いませんが、アダプター配列付きプライマーを使用した PCR でプライマーダイマーが

でしやすい場合 (ターゲットとする増幅産物がほとんどできない)、3 段階の PCR を行わざるを得ないことがあります。

プライマーは様々な業者が合成サービスを提供していますが、品質、価格ともに IDT <https://sg.idtdna.com/jp/site/> が特に優れているため、特段の事情がない限り IDT の合成サービスに依頼することを強く推奨します。特に、縮重塩基を含むプライマーを発注する際には、必ず IDT に依頼して下さい。他社では縮重塩基の混合比率が均等になっていないことが多いからです。IDT では、Machine Mix と Hand Mix が選べますが、Machine Mix (プライマー配列中に N などと縮重塩基をそのまま書くだけ) で問題ありません。長いプライマーは合成ミスが増えるため、カートリッジ精製や PAGE 精製が推奨されますが、今のところ脱塩でも問題は起きていません。IDT で発注する際、Machine Mix でいいのか、PAGE 精製しなくていいのか、といった警告が表示されますが、筆者は無視してそのまま発注しています。不安な方はよく読んで適宜判断して下さい。

### アダプター配列付きプライマー

Illumina のシーケンサーで想定されているアダプター配列は Nextera キットで使用されているものと TruSeq キットで使用されているものの 2 種類があり、それぞれ下記のようになっています。

- Nextera
  - Forward: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG
  - Reverse: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG
- TruSeq
  - Forward: ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
  - Reverse: GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT

どちらを使用してもいいのですが、Nextera のアダプター配列を使用するとインデックス配列付きプライマーが 60 塩基以下に収まりますので、60 塩基が上限の安価な合成サービスを使用できるためコストが抑えられます。TruSeq アダプターはインデックス配列付きプライマーが 60 塩基を超えてしまうので高くなりますが、インデックス配列付きプライマーを使用した PCR のアニーリング温度が伸長温度と近くなるため、アニーリングと伸長のステップを統合して短時間で PCR を実施することができます。どちらの場合も、「何故かうまくいかない」サンプルやプライマーが存在し、どうしようもない場合はもう一方のアダプターを使用するように変更することを検討しなくてはならないことがあります。

Illumina のシーケンサーでは、解読中の塩基が多様なほど解読の質が高まります。これは、カメラで光を検出しているため、同一塩基ばかりのサンプルでは光が飽和して近接する点が区別できなくなってしまう性質があるためです。特に、最初の 6 塩基で塩基の多様度が低く、近接する点が区別できない場合、ほとんどデータが得られません。そこで、下記のように読み始めになる上述のアダプター配列直後に 6 塩基の N を挿入することで、塩基多様度を最大化します。

5' - [アダプター配列] - [NNNNNN] - [プライマー配列] - 3'

アダプター配列直後に 6 塩基の N を挿入するだけでも通常は問題ありませんが、7 塩基目以降も塩基多様度が高いに越したことはありません。そこで、下記の 4 種類のプライマーを等濃度で等量混合することで、PCR 産物の長さに変異を持たせる方法もあります。

```

5' - [アダプター配列] - [NNNNNN] - [プライマー配列] - 3'
5' - [アダプター配列] - [NNNNNN] - [XX] - [プライマー配列] - 3'
5' - [アダプター配列] - [NNNNNN] - [XXXX] - [プライマー配列] - 3'
5' - [アダプター配列] - [NNNNNN] - [XXXXXX] - [プライマー配列] - 3'

```

このとき、X は 4 種類のプライマーをコンセンサス配列を作成したときに N になるように塩基を決定します。例えば、MiFish-U-F (Miya *et al.*, 2015) で Nextera のアダプター配列を使用する場合、下記のような配列を使用します。

```

5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG NNNNNN GTCGGT AAAACTCGTGCCAGC - 3'
5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG NNNNNN HVGTCG GTAAACTCGTGCCAGC - 3'
5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG NNNNNN HVWMGT CGGTAAACTCGTGCCAGC - 3'
5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG NNNNNN HVWMWM GTCGGTAAACTCGTGCCAGC - 3'

```

このようにしてライブラリを調製しても、PCR 産物の塩基多様度は RNA-seq や全ゲノムショットガンのライブラリよりは低くなりやすいので、Illumina の推奨する濃度よりも低くしてシーケンサーにアプライするようにします (PhiX との合計で 2 割程度薄めにする)。筆者は MiSeq の v2 キットでシーケンスする場合、PhiX なし、終濃度 8pM でカートリッジにアプライしています。IDT での購入時は、100μM の IDTE 溶液で納品してもらうと手間が減ります。プライマーは凍結融解を繰り返すことになってしまいますが、IDTE に溶解したものはあまり気にする必要はないようです (Speicher, 2017)。SPW で希釈したものは、凍結融解は 5 回以下で使い切るようにしています。

### インデックス配列付きプライマー

アダプター配列付きプライマーで PCR しただけでは、由来サンプルを区別することができず、多サンプルを 1 回のシーケンスランで解読することができません。そもそも Illumina のシーケンサーでの解読に必要な P5・P7 配列もまだ付加されていません。P5・P7 配列は下記の配列で、それぞれフォワード側、リバース側に付加させる必要があります。

- P5: AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
- P7: CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT

そこで、下記のようなアダプター配列にアニールするプライマーを用いて、由来サンプル識別用のインデックス配列と P5・P7 配列を付加します (X にはインデックス配列が入ります)。

```

5' - [P5・P7 配列] - [インデックス配列] - [プライマー配列] - 3'
5' - AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC XXXXXXXX TCGTCGGCAGCGTC - 3'
5' - CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT XXXXXXXX GTCTCGTGGGCTCGG - 3'

```

上記のプライマー配列は Nextera のアダプター配列用のもので、TruSeq の場合はプライマー配列にはアダプター配列をそのまま用います。

Nextera のアダプター配列を用いたインデックス配列付きプライマーをフォワード・リバース各 24 セット (Set A~X) 作成したものを <https://github.com/astanabe/NexteraStyleIndexPrimers> にて公開しています (v2 と呼んでいるもの)。このインデックス配列付きプライマーは、1 セット内で同じ位置の塩基多様度ができるだけ低くならないように作成されています。また、インデックス配列間では全て互いに 3 塩基以上異なっており、GC 含量が極端に高くなったり、GC か AT が 3 連続以上出現しないようにしてあります。フォワードの 1 セット 8 本とリバースの 1 セット 12 本を 96 ウェルプレートの行と列に使用することで、96 サンプルの識別ができるようになります。このようなインデックスの使用法を Illumina は Combinatorial Dual Indexing と呼んでいます。組み合わせる際は、A どうし、B どう

し・・・X どうして組み合わせるのが望ましいですが、半分以上の組み合わせを未使用にさえすれば、他の組み合わせでも問題ありません。例えば 384 サンプルのマルチプレックスの場合、A - A, B - B, C - C, D - D (異なるセットの組み合わせが未使用) や A - A, A - B, B - C, B - D (A - C, A - D, B - A, B - B が未使用) の組み合わせで使います。

シーケンサーの機種によっては Combinatorial Dual Indexing が推奨されないものがあり、その場合は Unique Dual Indexing を行う必要があります。これは、全サンプルで Index 1 も Index 2 もどちらも重複しないようにするものです。96 サンプルを識別するために、フォワード側が 96 種類、リバーズ側が 96 種類のインデックス配列付きプライマーが必要ということです。例えば NovaSeq や HiSeq 3000/4000 では Unique Dual Indexing が推奨されているため、それを前提としたライブラリ調製を行う必要があります。ライブラリに入れるサンプル数が増える場合、インデックスが不足する場合がありますが、その場合はインデックスを 8 塩基から 10 塩基に伸ばします。前述のウェブページでは、10 塩基長の Dual Index が前後各 96 種類 × 40 セット = 3840 サンプル識別可能なものがありますが、まだ使用どころかプライマーを発注したこともないので本当に使えるかどうかはわかりません。多数のプライマーが必要になるため資金もより多く必要となりますが、MiSeq や HiSeq 2000/2500 でも、Unique Dual Indexing の方がインデックス配列の誤認識によるサンプル間のデータの人工的なコンタミネーションのトラブルは減少します。

なお、Illumina のシーケンサーではインデックス配列は**フォワード側を Index 2、リバーズ側を Index 1**として解読します。解読の向きは機種によって異なっており、**Index 2 は NovaSeq, MiSeq, HiSeq 2000/2500 では名前に含まれる配列のまま、iSeq, MiniSeq, NextSeq, HiSeq 3000/4000 では逆向き**になります。**Index 1 は全機種で名前に含まれる配列が逆向きに解読**されます。

インデックス配列付きプライマーはコンタミネーションを避けるため、全プライマーを独立したチューブで発注・保管し、使用直前に 8 連・12 連チューブで必要な濃度に希釈して使用することを推奨しますが、IDTE は EDTA の含有量が少なく増幅阻害効果が小さいため、IDTE で希釈した状態で保管しても構いません。購入時は 50 $\mu$ M の濃度で納品していただくのがよいでしょう。これは、100 $\mu$ M だと量り取る際に必要な容量が小さくなりすぎて精度が低くなりやすいためです。セット単位で並べられるよう、96 穴のチューブラックやフリーズボックスを使用すると便利です。IDTE で希釈した状態で保管するのであれば、購入時の濃度は 50 $\mu$ M でも 100 $\mu$ M でも構いません。希釈後の濃度は 5 $\mu$ M にします。

Unique Dual Indexing を使用する場合は、インデックス配列付きプライマーは 96 ウェルディープウェルプレート入で全ウェル等量の 100 $\mu$ M の IDTE 溶液として納品していただくのがいいでしょう。納品後にフォワードインデックスプライマーとリバーズインデックスプライマーを混合して、IDTE で各 5 $\mu$ M に希釈した状態で 96 ウェルプレートに保管しておきます。ディープウェルプレートでプライマーを購入する場合、ディープウェルプレートが遠心可能なプレート遠心機が必要になりますのでご注意ください。

プライマーは凍結融解を繰り返すことになりますが、IDTE に溶解したものはあまり気にする必要はないようです (Speicher, 2017)。また、冷蔵保管でもよほどの長期間でない限り問題はありません。ただし、カビの発生には注意が必要です。

### 2.5.3 アニール温度と DNA 合成酵素の決定

アニール温度はプライマーの**鋳型にアニールする部位**の Tm 値に基づいて決定します。したがって、Tm 値の計算にはアダプター配列やインデックス配列、P5・P7 配列は含めません。アダプター配列付きプライマーに挿入する NNNNNN とその延長部位も含めません。最近の高正確性酵素のほとんどは Taq とはバッファー組成が異なるため、Taq

用に計算された  $T_m$  値よりもずっと高いアニーリング温度を設定する必要があります。どの程度アニーリング温度を上げるべきかはプライマーや酵素、サンプルによって微妙に異なりますが、New England BioLabs では、自社取扱酵素専用の  $T_m$  値を計算してくれる Web サイト <http://tmcalculator.neb.com/> を提供してくれていますので、この Web サイトで計算させた  $T_m$  値を使用できます。筆者は New England BioLabs の Q5 Hot Start を多用していますが、最大の理由がこれです。ただし、このサイトで計算してくれる  $T_m$  値は配列が完全一致する場合の値ですので、数塩基程度の不一致はよくあると考えられるユニバーサルプライマーでは、2~3°C 程度下げた方がいいことが多いです (それでも Taq 用の値よりもずっと高くなります)。他社の高正確性酵素の場合、専用の  $T_m$  値計算サイトなどがあればそれを使えばいいですが、ない場合は上記のサイトで Q5 か Phusion での  $T_m$  値を参考にするといいでしょう。後述するテスト用 PCR の際にサーマルサイクラーのグラジエント機能などを使用して最適なアニーリング温度を探索するのも悪くありませんが、サンプルごとに最適値は異なりますし、サンプルごとに最適値を探索するのは大変ですから、非特異的増幅があまり生じない範囲でできるだけ低くするのが望ましいでしょう。

PCR のプログラムを作成する際、可能であれば変性温度からアニーリング温度への降下速度を低下させる (0.5~1°C/sec) と、キメラ配列の形成が抑制できます (Stevens *et al.*, 2013)。アニーリング温度への降下速度を低下させることで、PCR の特異性もやや改善していると感じています。

上述の Q5 Hot Start 以外の酵素としては、特に増幅が困難なサンプルでは KOD FX Neo が有効なことを確認しています。その他、Phusion や KAPA HiFi といった高正確性酵素が多く用いられています。正確性やキメラ配列の形成されやすさに違いがあり、いくつかの研究があります (Potapov and Ong, 2017; Sze and Schloss, 2019)。なお、非特異的増幅の起きやすさにも多少違いがあるように思いますので、色々試してみるといいでしょう。

なお、アガロースゲル電気泳動の際にそのままアプライできるようにする、色素とグリセリンの入ったバッファーやマスターミックスが販売されていることがありますが、磁気ビーズを用いた PCR 産物の精製を行う場合、グリセリンが存在していると回収率が低下することが知られているため、使用の際は注意が必要です。筆者はほとんどの酵素で利用できる、10x のローディングダイ (作成方法は付録 B.3 を参照) を作成し、電気泳動を行う場合はこれを予め入れて PCR を行っています。このローディングダイを入れた場合と入れなかった場合で結果が変わるようでは困るのですが、今のところそのような例はありません。

## 2.5.4 鋳型 DNA 希釈率の決定

鋳型 DNA 溶液には、DNA だけでなく増幅阻害物質も混入しています。そのため、サンプルによっては PCR がうまくいかず、増幅できない場合があります。これに対処するには、何らかの精製を行うか、PCR に鋳型 DNA を加える際に大幅に希釈することによって、増幅阻害物質の影響を低減させる必要があります。希釈が最も簡易な対処方法なので、ここではこれを採用します (磁気ビーズを用いた精製方法は第 2.4.6 節を参照)。

希釈法を用いる場合、希釈率を決定しなくてはなりません。そこで、最初に解析対象のサンプルから 12~24 サンプル程度選択し、これらを 5 倍希釈、10 倍希釈、20 倍希釈で鋳型として使用して PCR を行い、アガロースゲル電気泳動で増幅確認を行います。これで最も成績の良かった希釈率を採用します。なお、実際のライブラリ調製では 2 段階、もしくは 3 段階の PCR を行うため、1 段階の PCR に比べて増幅しやすく、ここで増幅が確認できないサンプルでもシーケンスデータは得られることが多いと思います。これまでのところ、10 倍希釈を用いるのが最も成績が良くなることが多い印象ですが、土壌やため池などの増幅阻害物質の多そうなサンプルでは、20 倍希釈が必要な場合もありました。

なお、必要な希釈率は、DNA ポリメラーゼによって大きく異なることがあります。クールドサンプルに強いとされて

いる KOD FX Neo では、希釈があまり必要ないことが多いですが、KAPA HiFi は増幅阻害物質の影響を受け易いらしく、大幅に希釈しなくてはならないことがあります。筆者はほとんどの場合 Q5 Hot Start を用いていますが、これも KOD FX Neo ほどは増幅成功率は高くなく、ある程度は希釈が必要なが多いです。希釈することを見越して、最初からスピнкаラムからの DNA 溶出に用いるバッファーを増やしたり溶出回数を増やすことで、スピнкаラムからの DNA 回収率を向上させることも可能だと思いますが、DNA は既に十分回収できていて阻害物質の回収率が上がってしまう、という可能性もあると思いますので、慎重に検討して下さい。

### 2.5.5 ユニバーサルプライマーを用いた PCR のプロトコル (テスト用)

#### 必要な機材

- 12 連 10 $\mu$ L 電動ピペット Eppendorf Xplorer 4861000112 または Sartorius Picus 735421: 1 本 (ない場合は 20 $\mu$ L 電動ピペットで 12 回連続分注する)
- 20 $\mu$ L 電動ピペット アイカス・ラボ Pipetty TLIC01-20 または エー・アンド・デイ MPA-20: 1 本
- 200 $\mu$ L 電動ピペット アイカス・ラボ Pipetty TLIC01-250 または エー・アンド・デイ MPA-200: 1 本
- アイソフリーズラック PCR ラック: 1 個
- プレート遠心機 または 野菜水切り器: 1 台
- 96 ウェルプレート対応サーマルサイクラー: 1 台

#### 必要な試薬・消耗品

- 1.5mL チューブ: 1 本 / 96 ウェル
- 96 ウェルプレート: 1 枚 / 4 サンプル (濃度 3 段階各 8 レプリケート)
- プレートシール: 1 枚 / 4 サンプル
- 10x ローディングダイ (作成方法は付録 B.3 を参照): 1.25 $\mu$ L / 1 ウェル
- 5x Q5 Reaction Buffer: 2.5 $\mu$ L / 1 ウェル
- 5x Q5 High GC Enhancer: 2.5 $\mu$ L / 1 ウェル
- 10mM dNTPs: 0.25 $\mu$ L / 1 ウェル
- 10 $\mu$ M フォワードプライマー: 0.6 $\mu$ L / 1 ウェル
- 10 $\mu$ M リバースプライマー: 0.6 $\mu$ L / 1 ウェル
- SPW: 4.2 $\mu$ L / 1 ウェル
- Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (2U/ $\mu$ L): 0.1 $\mu$ L / 1 ウェル
- 鋳型 DNA 溶液: 3.5 $\mu$ L / 1 サンプル
- 8 連チューブ: 12/8 本 / 4 サンプル
- SPW: 14 $\mu$ L / 1 サンプル
- SPW: 5 $\mu$ L / 1 サンプル
- SPW: 7.5 $\mu$ L / 1 サンプル

## 作業手順

1. 冷凍試薬、プライマー、鋳型 DNA 溶液を解凍してボルテックスしてスピンドウン
2. 1.5mL チューブに 10x ローディングダイ 1.25 $\mu$ L、5x Q5 Reaction Buffer 2.5 $\mu$ L、5x Q5 High GC Enhancer 2.5 $\mu$ L、10mM dNTPs 0.25 $\mu$ L、10 $\mu$ M フォワードプライマー 0.6 $\mu$ L、10 $\mu$ M リバースプライマー 0.6 $\mu$ L、SPW 4.2 $\mu$ L を (ウェル数 +X) 倍入れてボルテックスしてスピンドウン (X は 24 ウェルごとに 1。48 ウェルなら X=2。96 ウェルなら X=4)
3. 8 連チューブ 12/8 本を用意し、3 つ飛ばしの 4 ウェルに SPW を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 14 $\mu$ L ずつ分注する
4. 鋳型 DNA 溶液 3.5 $\mu$ L を 3 の SPW に加えることで 5 倍希釈液 17.5 $\mu$ L を作る
5. 5 倍希釈液の隣の 4 ウェルに SPW を 20 $\mu$ L 電動ピペットで 5 $\mu$ L ずつ分注する
6. 5 倍希釈液 5 $\mu$ L を 5 の SPW に加えることで 10 倍希釈液 10 $\mu$ L を作る
7. 10 倍希釈液の隣の 4 ウェルに SPW を 20 $\mu$ L 電動ピペットで 7.5 $\mu$ L ずつ分注する
8. 5 倍希釈液 2.5 $\mu$ L を 7 の SPW に加えることで 20 倍希釈液 10 $\mu$ L を作る
9. 8 連チューブをスピンドウン
10. アイソフリーズ PCR ラックに 96 ウェルプレート置く
11. 2 に Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2U/ $\mu$ L) 0.1 $\mu$ L $\times$ (ウェル数 +X) を加えて転倒混和してスピンドウンして、**入れたことがわかるよう目印を付ける**
12. 96 ウェルプレート全体に 10 の混合液を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 12 $\mu$ L ずつ分注する
13. 96 ウェルプレートの各列の 8 ウェルに鋳型 5 $\cdot$ 10 $\cdot$ 20 倍希釈液を 12 連 10 $\mu$ L 電動ピペットまたは 20 $\mu$ L 電動ピペットで 1 $\mu$ L ずつ分注する
14. 96 ウェルプレートにプレートシールをしっかりと貼ってスピンドウンして容量のずれがないか目視確認
15. 96 ウェルプレートをアイソフリーズラックに乗せたままサーマルサイクラーのある部屋に移動
16. 96 ウェルプレートをセットせずにサーマルサイクラーのプログラムをスタートさせ、初期変性温度に達したら一時停止する
17. 96 ウェルプレートをセットしてプログラムを再開する
18. 終わったら十分冷めるまで待って、96 ウェルプレートをサーマルサイクラーから取り外す
19. プレートシールを押さえて浮き上がった部分をしっかりと貼り付ける
20. スピンドウンして容量のずれがないか目視確認
21. 冷蔵庫に一時保管 (1 ヶ月以上の長期の場合は冷凍庫へ)

## PCR プログラム例

1. 98 $^{\circ}$ C 3min
2. 98 $^{\circ}$ C 10sec
3. 65 $^{\circ}$ C 20sec (降下速度 0.5 $^{\circ}$ C/sec)
4. 72 $^{\circ}$ C 20sec
5. 2 に戻る (46 回 $\cdot$ 47 サイクル)
6. 72 $^{\circ}$ C 10min
7. 10 $^{\circ}$ C

各サンプルを4レプリケートずつに減らして、一度に8サンプルをテストしてもいいでしょう。

Pipetty TLIC01-250で20 $\mu$ L以下の容量の分注を行うと、設定よりもやや多めに出る傾向があります。5~10 $\mu$ Lでは0.3 $\mu$ L程度、10~15 $\mu$ Lでは0.2 $\mu$ L程度、15~20 $\mu$ Lでは0.1 $\mu$ L程度少なめに設定するといいいでしょう。

上記プロトコルでは本来12.5 $\mu$ Lが各ウェルの総容量になりますが、水分がPCRの最中に水蒸気になったり側面に付着したりするため、0.5 $\mu$ L多めにしています。

96ウェルプレートにサーマルサイクラーにセットしてから、中身が設定温度になるまで少し時間がかかるため、初期変性の時間を長めにしています。完了後の冷却温度は4 $^{\circ}$ Cに設定することが多いですが、4 $^{\circ}$ Cではサーマルサイクラーの寿命が縮みやすいので、10 $^{\circ}$ Cに設定しています。

## 2.5.6 アガロースゲル電気泳動のプロトコル

### 必要な機材

- 20 $\mu$ L電動ピペット アイカマス・ラボ Pipetty TLIC01-20 または エー・アンド・デイ MPA-20: 1本
- 12連10 $\mu$ Lピペット: 1本
- プレート遠心機 または 野菜水切り器: 1台
- ADVANCE Mupid-One: 1台
- ADVANCE ゲルメーカーセット One-HR: 1セット
- 300mLビーカー: 1個
- トランスイルミネーター (300nm前後のUVか470nm前後の青色LED): 1台

### 必要な試薬・消耗品

- 1x TAE: 350mL
- 1x TAE: 80mL
- 日本ジェネティクス Midori Green Advance: 4 $\mu$ L
- ニッポンジーン アガロース S または 関東化学 アガロース KANTO S または 理科研 STAR Agarose Powder: 1.6g
- ローディングダイ入PCR産物: 6 $\mu$ L
- New England BioLabs Quick-Load Purple 50 bp DNA Ladder (N0556S): 20 $\mu$ L

### 作業手順

1. ビーカーに1x TAE 350mLを量り取ってMupidの泳動層に入れる
2. ゲルメーカーセットから必要なものを選び、電子レンジのそばに配置しておく
3. ビーカーに1x TAE 50mLとアガロース1.6gを入れて電子レンジで加熱してよく振って溶かす
4. 再度電子レンジで加熱し、沸騰したら取り出して1x TAE 30mLを加えて振る
5. Midori Green Advance 4 $\mu$ Lを入れてよく混ぜ、すぐにゲルメーカーセットの型に流し込んでコームを4本挿して(26ウェル側を使用)、ゲルが固まるまで置いておく



6. 完全に固まったゲルからコームを抜き、泳動槽にセットする
7. ローディングダイ入 PCR 産物をスピンドウンしてプレートシールを剥がす
8. 12 連ピペットで PCR 産物をピペッティングを 2 回してから 5 $\mu$ L 吸取り、そのままゲルにアプライする
9. ラダーマーカーを 20 $\mu$ L 電動ピペットで 5 $\mu$ L ずつ空ウェルにアプライする
10. 泳動槽の蓋を閉め、極性方向に注意して泳動を開始する (+ 方向に動く)
11. 流れ切らないように注意して泳動を終了し、ラップを引いたトランスイルミネーターで泳動像を確認する

12 連ピペットに装着する 10 $\mu$ L チップはショートタイプを用います。ロングタイプでは先端がずれやすいため、アプライが難しくなります。PCR 産物がローディングダイ入ではない場合、PCR 産物 5 $\mu$ L に 1 $\mu$ L の 6x ローディングダイを混ぜてアプライします。

48 サンプルや 24 サンプルの場合は、コームの本数を減らしたり、ハーフサイズのゲルを用いたりしても構いません。より高解像度で分離したい場合、コームの本数を減らして泳動距離を延ばし、電圧を下げたり冷やしながら泳動することで改善します。資金があるなら、高分解能アガロースを用いてもいいでしょう。

### 2.5.7 ユニバーサルプライマーを用いた PCR のプロトコル (本番用)

ここでは、5 倍希釈液 1 $\mu$ L が鋳型の最適だった場合のプロトコルを記します。分注時のぶれを少なくするため、10 倍希釈液 2 $\mu$ L を鋳型として使用しています。

#### 必要な機材

- 12 連 10 $\mu$ L 電動ピペット Eppendorf Xplorer 4861000112 または Sartorius Picus 735421: 1 本 (ない場合は 20 $\mu$ L 電動ピペットで 12 回連続分注する)
- 20 $\mu$ L 電動ピペット アイカス・ラボ Pipetty TLIC01-20 または エー・アンド・デイ MPA-20: 1 本
- 200 $\mu$ L 電動ピペット アイカス・ラボ Pipetty TLIC01-250 または エー・アンド・デイ MPA-200: 1 本
- アイソフリーズラック PCR ラック: 1 個
- プレート遠心機 または 野菜水切り器: 1 台
- 96 ウェルプレート対応サーマルサイクラー: 1 台

#### 必要な試薬・消耗品

- 1.5mL チューブ: 1 本 / 96 ウェル
- 96 ウェルプレート: 1 枚 / 12 サンプル (各 8 レプリケート)
- プレートシール: 1 枚 / 4 サンプル
- 5x Q5 Reaction Buffer: 2.5 $\mu$ L / 1 ウェル
- 5x Q5 High GC Enhancer: 2.5 $\mu$ L / 1 ウェル
- 10mM dNTPs: 0.25 $\mu$ L / 1 ウェル
- 10 $\mu$ M フォワードプライマー: 0.6 $\mu$ L / 1 ウェル
- 10 $\mu$ M リバースプライマー: 0.6 $\mu$ L / 1 ウェル

- SPW: 4.45 $\mu$ L / 1 ウェル
- Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (2U/ $\mu$ L): 0.1 $\mu$ L / 1 ウェル
- 鋳型 DNA 溶液: 1.8 $\mu$ L / 1 サンプル
- 8 連チューブ: 12/8 本 / 12 サンプル
- SPW: 16.2 $\mu$ L / 1 サンプル

#### 作業手順

1. 冷凍試薬、プライマー、鋳型 DNA 溶液を解凍してボルテックスしてスピンドウン
2. 1.5mL チューブに 5x Q5 Reaction Buffer 2.5 $\mu$ L、5x Q5 High GC Enhancer 2.5 $\mu$ L、10mM dNTPs 0.25 $\mu$ L、10 $\mu$ M フォワードプライマー 0.6 $\mu$ L、10 $\mu$ M リバースプライマー 0.6 $\mu$ L、SPW 4.45 $\mu$ L を (ウェル数 +X) 倍入れてボルテックスしてスピンドウン (X は 24 ウェルごとに 1。48 ウェルなら X=2。96 ウェルなら X=4)
3. 8 連チューブ 12/8 本を用意し、12 ウェルに SPW を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 16.2 $\mu$ L ずつ分注する
4. 鋳型 DNA 溶液 1.8 $\mu$ L を 3 の SPW に加えることで 10 倍希釈液 18 $\mu$ L を作る
5. 8 連チューブをスピンドウン
6. アイソフリーズ PCR ラックに 96 ウェルプレート置く
7. 2 に Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2U/ $\mu$ L) 0.1 $\mu$ L $\times$ (ウェル数 +X) を加えて転倒混和してスピンドウンして、**入れたことがわかるよう目印を付ける**
8. 96 ウェルプレート全体に 7 の混合液を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 11 $\mu$ L ずつ分注する
9. 96 ウェルプレートの各列の 8 ウェルに鋳型 10 倍希釈液を 12 連 10 $\mu$ L 電動ピペットまたは 20 $\mu$ L 電動ピペットで 2 $\mu$ L ずつ分注する
10. 96 ウェルプレートにプレートシールをしっかりと貼ってスピンドウンして容量のずれがないか目視確認
11. 96 ウェルプレートをアイソフリーズラックに乗せたままサーマルサイクラーのある部屋に移動
12. 96 ウェルプレートをセットせずにサーマルサイクラーのプログラムをスタートさせ、初期変性温度に達したら一時停止する
13. 96 ウェルプレートをセットしてプログラムを再開する
14. 終わったら十分冷めるまで待って、96 ウェルプレートをサーマルサイクラーから取り外す
15. プレートシールを押さえて浮き上がった部分をしっかりと貼り付ける
16. スピンドウンして容量のずれがないか目視確認
17. 冷蔵庫に一時保管 (1 ヶ月以上の長期の場合は冷凍庫へ)

#### PCR プログラム例

1. 98°C 3min
2. 98°C 10sec
3. 65°C 20sec (降下速度 0.5°C/sec)
4. 72°C 20sec
5. 2 に戻る (34 回・35 サイクル)
6. 72°C 10min
7. 10°C

Pipetty TLIC01-250 で 20 $\mu$ L 以下の容量の分注を行うと、設定よりもやや多めに出る傾向があります。5～10 $\mu$ L では 0.3 $\mu$ L 程度、10～15 $\mu$ L では 0.2 $\mu$ L 程度、15～20 $\mu$ L では 0.1 $\mu$ L 程度少なめに設定するといいいでしょう。

上記プロトコルでは本来 12.5 $\mu$ L が各ウェルの総容量になりますが、水分が PCR の最中に水蒸気になったり側面に付着したりするため、0.5 $\mu$ L 多めにしています。

96 ウェルプレートにサーマルサイクラーにセットしてから、中身が設定温度になるまで少し時間がかかるため、初期変性の時間を長めにしています。完了後の冷却温度は 4 $^{\circ}$ C に設定することが多いですが、4 $^{\circ}$ C ではサーマルサイクラーの寿命が縮みやすいので、10 $^{\circ}$ C に設定しています。

## 2.5.8 磁気ビーズを用いた PCR 産物の精製プロトコル

磁気ビーズに目的の長さの DNA を選択的に吸着させることで、プライマーダイマーや dNTP、残ったプライマーなどを除去します。なお、ここでは 300bp 未満の DNA 断片を除去し、300bp 以上の断片を回収すると仮定しています。回収したい DNA サイズが異なる場合は、後述する目安を参考に MagNA 液量を変更する必要があります。磁気ビーズアッセイ対応のプレートウォッシャー (TECAN HydroSpeed 等) を使用することで、処理を自動化することができます。

### 必要な機材

- 12 連 100 $\mu$ L 電動ピペット Eppendorf Xplorer Plus 4861000791 または Sartorius Picus 735441: 1 本
- 200 $\mu$ L 電動ピペット アイカムス・ラボ Pipetty TLIC01-250 または エー・アンド・デイ MPA-200: 1 本
- 12 連 200 $\mu$ L ピペット: 1 本
- 96 ウェルプレート用磁気スタンド: 1 台 (自作方法は A.5 を参照)
- Fisher Scientific マイクロプレートボルテックスミキサー デジタル (アズワン品番 62-1609-23): 1 台

### 必要な試薬・消耗品

- 96 ウェルプレート: 1～2 枚 / 96 サンプル
- プレートシール: 2～3 枚 / 96 サンプル
- リザーバー: 1 枚 / 96 サンプル
- MagNA 液 (作成方法は付録 B.4 を参照): 32 $\mu$ L / 1 サンプル (約 3.2mL / 96 サンプル)
- PCR 産物: 40 $\mu$ L (8 レプリケート各 5 $\mu$ L) / 1 サンプル  $\times$  96 サンプル
- IDTE: 42 $\mu$ L / 1 サンプル (約 4.2mL / 96 サンプル)
- 作りたての 70% エタノール: 300 $\mu$ L / 1 サンプル (約 30mL / 96 サンプル)

### 作業手順

1. MagNA 液を 30 分程度放置して室温に戻す
2. MagNA 液を転倒混和して磁気ビーズを均一にする
3. 96 ウェルプレート全体に MagNA 液を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 32 $\mu$ L ずつ分注する

4. 12 連 100 $\mu$ L 電動ピペットを用いて 96 ウェルプレート上の PCR 産物の 8 レプリケートから 5 $\mu$ L ずつ吸引し、合計 40 $\mu$ L を 3 の 96 ウェルプレートの 1 行 (12 ウェル) に加える
5. プレートシールをしっかりと貼って 3500rpm で 10 秒ボルテックス (目視確認して混ざってなければ繰り返す)
6. 500 $\times$ g で 5 秒遠心してスピンドウン
7. 20°C 5 分インキュベート
8. 70% エタノールを 50mL 遠沈管で量り取ってリザーバーに入れる
9. プレートシールを剥がして磁気スタンドに立て、2 分静置する
10. ビーズに触れないよう注意して溶液を 12 連 200 $\mu$ L ピペットで吸い取って捨てる
11. 磁気スタンドに立てたまま、12 連 200 $\mu$ L ピペットで 70% エタノールを 150 $\mu$ L ずつ加えて、泡立たないように数回ピペッティングしてから吸い取って捨てる
12. 磁気スタンドに立てたまま、12 連 200 $\mu$ L ピペットで 70% エタノールを 150 $\mu$ L ずつ加えて、泡立たないように数回ピペッティングしてから吸い取って捨てる (できるだけ除去)
13. 磁気スタンドから外して 20°C で 3 分インキュベート (磁気ビーズを適度に乾かす。乾かしすぎるとビーズが割れて回収率低下するので注意)
14. IDTE を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 42 $\mu$ L ずつ加えてプレートシールをしっかりと貼る
15. 3500rpm で 10 秒ボルテックス (目視確認して混ざってなければ繰り返す)
16. 500 $\times$ g で 5 秒遠心してスピンドウン
17. サーマルサイクラーにセットして 37°C で 5 分インキュベート
18. 磁気ビーズを除くなら、プレートシールを剥がして 12 連 200 $\mu$ L ピペットで 40 $\mu$ L を吸って新しい 96 ウェルプレートに移す
19. プレートシールをしっかりと貼って冷蔵庫に一時保管 (1 ヶ月以上の長期の場合は冷凍庫へ)

#### 回収したい DNA サイズと MagNA 液の量の目安

200bp 以上	DNA 溶液と等量
250bp 以上	DNA 溶液の 0.9 倍
300bp 以上	DNA 溶液の 0.8 倍
400bp 以上	DNA 溶液の 0.7 倍
500bp 以上	DNA 溶液の 0.65 倍

作業は磁気ビーズが乾きすぎないように迅速に行います。

この後、すぐに磁気ビーズを用いた濃度均一化を行うのであれば、エタノールによる洗浄作業は 1 回で構いません。

磁気ビーズは長期間でなければ入れっぱなしでも構いません。ただし、溶液を使用する際に磁気ビーズが混入しないように注意する必要があります。

#### 2.5.9 磁気ビーズを用いた PCR 産物の濃度均一化プロトコル

ごく少量の磁気ビーズに DNA を吸着させてあぶれた DNA を除去することで、サンプル間の DNA 濃度を均一化します。磁気ビーズアッセイ対応のプレートウォッシャー (TECAN HydroSpeed 等) を使用することで、処理を自動化する

ことができます。この方法では、どのサンプルがどれだけ希釈されたかの情報が得られないので、リード数から濃度を推定してサンプル間で比較することはできません。

#### 必要な機材

- 200 $\mu$ L 電動ピペット アイカムス・ラボ Pipetty TLIC01-250 または エー・アンド・デイ MPA-200: 1 本
- 12 連 200 $\mu$ L ピペット: 1 本
- 12 連 100 $\mu$ L ピペット: 1 本
- 96 ウェルプレート用磁気スタンド: 1 台 (自作方法は A.5 を参照)
- Fisher Scientific マイクロプレートボルテックスミキサー デジタル (アズワン品番 62-1609-23): 1 台

#### 必要な試薬・消耗品

- 96 ウェルプレート: 1~2 枚 / 96 サンプル
- プレートシール: 2~3 枚 / 96 サンプル
- リザーバー: 1 枚 / 96 サンプル
- BeNUS 液 (作成方法は付録 B.5 を参照): 40 $\mu$ L / 1 サンプル (約 4mL / 96 サンプル)
- イソプロパノール 分子生物学用: 40 $\mu$ L / 1 サンプル (約 4mL / 96 サンプル)
- 磁気ビーズ精製済み PCR 産物: 40 $\mu$ L / 1 サンプル  $\times$  96 サンプル
- IDTE: 21 $\mu$ L / 1 サンプル (約 2.1mL / 96 サンプル)
- 作りたての 70% エタノール: 150 $\mu$ L / 1 サンプル (約 15mL / 96 サンプル)

#### 作業手順

1. BeNUS 液を 30 分程度放置して室温に戻す
2. BeNUS 液を転倒混和して磁気ビーズを均一にする
3. 96 ウェルプレート全体に BeNUS 液とイソプロパノールを 200 $\mu$ L 電動ピペットで 40 $\mu$ L ずつ分注する
4. 12 連 200 $\mu$ L ピペットを用いて 96 ウェルプレート上の磁気ビーズ精製済み PCR 産物 40 $\mu$ L を 3 の 96 ウェルプレートの 1 行 (12 ウェル) に加える
5. プレートシールをしっかりと貼って 3500rpm で 10 秒ボルテックス (目視確認して混ざってなければ繰り返す)
6. 500 $\times$ g で 5 秒遠心してスピンドウン
7. 20 $^{\circ}$ C 5 分インキュベート
8. 70% エタノールを 50mL 遠沈管で量り取ってリザーバーに入れる
9. プレートシールを剥がして磁気スタンドに立て、2 分静置する
10. ビーズに触れないよう注意して溶液を 12 連 200 $\mu$ L ピペットで吸い取って捨てる
11. 磁気スタンドに立てたまま、12 連 200 $\mu$ L ピペットで 70% エタノールを 150 $\mu$ L ずつ加えて、泡立たないよう数回ピペッティングしてから吸い取って捨てる (できるだけ除去)
12. 磁気スタンドから外して 20 $^{\circ}$ C で 3 分インキュベート (磁気ビーズを適度に乾かす。乾かしすぎるとビーズが割れて回収率低下するので注意)
13. IDTE を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 21 $\mu$ L ずつ加えてプレートシールをしっかりと貼る

14. 3500rpm で 10 秒ボルテックス (目視確認して混ざってなければ繰り返す)
15. 500×g で 5 秒遠心してスピンドウン
16. サーマルサイクラーにセットして 37°C で 5 分インキュベート
17. 磁気ビーズを除くなら、プレートシールを剥がして 12 連 100μL ピペットで 20μL を吸って新しい 96 ウェルプレートに移す
18. プレートシールをしっかり貼って冷蔵庫に一時保管 (1 ヶ月以上の長期の場合は冷凍庫へ)

作業は磁気ビーズが乾きすぎないように迅速に行います。

磁気ビーズは長期間でなければ入れっぱなしでも構いません。ただし、溶液を使用する際に磁気ビーズが混入しないように注意する必要があります。

### 2.5.10 蛍光色素を用いた濃度測定結果に基づく濃度均一化プロトコル

この方法では、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて多数の PCR 産物の濃度を一気に測定し、Bluetooth 対応電動ピペットでウェルごとに異なる量の希釈用 SPW を分注してから PCR 産物を混合することで濃度を均一化します。磁気ビーズを用いる方法とは異なり、希釈率が把握できるので、リード数から濃度を推定してサンプル間で比較することも可能です。なお、蛍光マイクロプレートリーダーがない場合でも、定量 PCR 用のサーマルサイクラーがある場合、その機種が蛍光強度の生データを出力可能であれば測定が可能だそうです。

#### 必要な機材

- 蛍光マイクロプレートリーダー: 1 台
- Bluetooth 対応 200μL 電動ピペット アイカムス・ラボ Pipetty Pro MSIC04-01-250: 1 本
- Bluetooth 対応 PC: 1 台
- 1000μL 電動ピペット アイカムス・ラボ Pipetty TLIC01-1000 または エー・アンド・デイ MPA-1200: 1 本
- 12 連 100μL ピペット: 1 本
- 12 連 10μL ピペット: 1 本
- 10μL ピペット: 1 本

#### 必要な試薬・消耗品

- ポリスチレン製 96 ウェル平底黒色マイクロプレート: 1 枚 (スタンダード測定用)
- ポリスチレン製 96 ウェル平底黒色マイクロプレート: 1 枚 / 96 サンプル
- 96 ウェルプレート: 1 枚 / 96 サンプル
- 50mL 遠沈管: 1 本
- Quant-iT dsDNA HS Reagent: 1μL / 1 サンプル
- Quant-iT dsDNA HS Buffer: 200μL / 1 サンプル
- λ dsDNA HS Standard #1: 10μL
- λ dsDNA HS Standard #2: 10μL

- $\lambda$  dsDNA HS Standard #3: 10 $\mu$ L
- $\lambda$  dsDNA HS Standard #4: 10 $\mu$ L
- $\lambda$  dsDNA HS Standard #5: 10 $\mu$ L
- $\lambda$  dsDNA HS Standard #6: 10 $\mu$ L
- $\lambda$  dsDNA HS Standard #7: 10 $\mu$ L
- $\lambda$  dsDNA HS Standard #8: 10 $\mu$ L
- サンプル DNA 溶液: 40 $\mu$ L (96 ウェルプレートに入っていると想定)

### 作業手順

1. 冷蔵しているスタンダードとバッファーを室温に戻す
2. Quant-iT dsDNA HS Reagent 1 $\mu$ L と Quant-iT dsDNA HS Buffer 200 $\mu$ L を測定サンプル数 + 8 倍量を遠沈管に入れてボルテックス
3. 1000 $\mu$ L 電動ピペットを用いてスタンダード測定用平底黒色マイクロプレートに 2 を 200 $\mu$ L ずつ 8 ウェルに分注
4. スタンダード各 10 $\mu$ L を 3 の使用ウェルに加えてピペッティングしてアルミホイルを被せて置いておく
5. 1000 $\mu$ L 電動ピペットを用いてサンプル測定用平底黒色マイクロプレートに 2 を 200 $\mu$ L ずつ分注
6. 12 連 10 $\mu$ L ピペットを用いてサンプル DNA 溶液 10 $\mu$ L を 5 に加えてピペッティングしてアルミホイルを被せる
7. 20°C で 5 分インキュベート
8. 蛍光マイクロプレートリーダーを用いてスタンダードを測定
9. 蛍光マイクロプレートリーダーを用いてサンプルを測定 (少し間を空けて 3 回測定して平均値を用いる)
10. 測定結果を PC に取り込んで、表計算ソフトで濃度均一化に必要な SPW 量をウェルごとに計算する
11. Bluetooth 対応 PC でウェルごとに分注する SPW 量を電動ピペットに送信
12. Bluetooth 対応 200 $\mu$ L 電動ピペットを用いて、1 ウェルごとに異なる量の SPW を 96 ウェルプレートに分注する (連続分注はしないこと)
13. 12 連 100 $\mu$ L ピペットを用いてサンプル DNA 溶液 30 $\mu$ L を 96 ウェルプレートに加えてピペッティング
14. プレートシールを貼って冷蔵庫に一時保管 (1 ヶ月以上の場合は冷凍庫へ)

濃度均一化に必要な SPW 量を計算する際には、ネガティブコントロールやほとんど PCR 産物ができていないと思われるサンプルは無視し、加える量が最小 20 $\mu$ L、最大 170 $\mu$ L になるよう標的濃度を決めます (ただしネガティブコントロールが PCR 産物を高濃度で含む場合は考慮します)。

予算を抑えたい方には、Promega QuantiFluor dsDNA System を使用することをおすすめします。Quant-iT dsDNA HS Assay Kit や、Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit よりも大幅に安価な二本鎖 DNA 蛍光検出定量キットです。使用方法はおおよそ同じですが、蛍光色素の希釈倍率が 400 倍なのと、スタンダードを自分で希釈して希釈系列を作成しないといけないこと、励起波長と蛍光波長がわずかに異なるのが Quant-iT dsDNA HS Assay Kit との違いです。逆に、バッファーによる希釈操作が必要ないキットもありますので、ランニングコストは上がりますが、手間を減らすことも可能です。

### 2.5.11 Exonuclease I を用いた PCR 産物の精製プロトコル

サンガーシーケンスでは、PCR 産物を ExoSAP (Exonuclease I と Shrimp Alkaline Phosphatase) で精製してサイクルシーケンス反応に用いることがありますが、Illumina 製シーケンサーでシーケンスする場合は dNTP の除去は必要ないため (どうせこの後でサイズ選択も行います)、Exonuclease I の処理だけで問題ありません。PCR 産物は 1 サンプル当たり 8 レプリケート分あり、ここで 8 レプリケートを一つにまとめると仮定しています。

#### 必要な機材

- 12 連 100 $\mu$ L 電動ピペット Eppendorf Xplorer Plus 4861000791 または Sartorius Picus 735441: 1 本
- 20 $\mu$ L 電動ピペット アイカムス・ラボ Pipetty TLIC01-20 または エー・アンド・デイ MPA-20: 1 本
- 96 ウェルプレート対応サーマルサイクラー: 1 台

#### 必要な試薬・消耗品

- 1.5mL チューブ: 1 本
- 96 ウェルプレート: 1 枚 / 96 サンプル
- New England BioLabs Exonuclease I (E. coli) 20U/ $\mu$ L: 0.4 $\mu$ L / 1 サンプル
- SPW: 3.6 $\mu$ L / 1 サンプル
- PCR 産物: 40 $\mu$ L (8 レプリケート各 5 $\mu$ L) / 1 サンプル  $\times$  96 サンプル

#### 作業手順

1. 1.5mL チューブに Exonuclease I 20U/ $\mu$ L 40 $\mu$ L と SPW 360 $\mu$ L を入れて転倒混和してスピンドウン
2. 96 ウェルプレートに Exonuclease I 2U/ $\mu$ L を 20 $\mu$ L 電動ピペットで 4 $\mu$ L ずつ分注する
3. 12 連 100 $\mu$ L 電動ピペットを用いて 96 ウェルプレートの PCR 産物の 8 レプリケートから 5 $\mu$ L ずつ吸引し、合計 40 $\mu$ L を 2 の 96 ウェルプレートの 1 行 (12 ウェル) に加える
4. 96 ウェルプレートにプレートシールをしっかりと貼ってスピンドウンして容量のずれがないか目視確認
5. サーマルサイクラーで 37°C90 分、80°C15 分処理する
6. 終わったら十分冷めるまで待って、96 ウェルプレートをサーマルサイクラーから取り外す
7. プレートシールを押さえて浮き上がった部分をしっかりと貼り付ける
8. スピンドウンして容量のずれがないか目視確認
9. 冷蔵庫に一時保管 (1 ヶ月以上の長期の場合は冷凍庫へ)



## 2.5.12 インデックスと P5・P7 アダプター配列を付加する PCR のプロトコル

### 必要な機材

- 12 連 10 $\mu$ L 電動ピペット Eppendorf Xplorer 4861000112 または Sartorius Picus 735421: 1 本 (ない場合は 20 $\mu$ L 電動ピペットで 12 回連続分注する)
- 20 $\mu$ L 電動ピペット アイカムス・ラボ Pipetty TLIC01-20 または エー・アンド・デイ MPA-20: 1 本
- 200 $\mu$ L 電動ピペット アイカムス・ラボ Pipetty TLIC01-250 または エー・アンド・デイ MPA-200: 1 本
- 12 連 10 $\mu$ L ピペット: 1 本
- アイソフリーズラック PCR ラック: 1 個
- プレート遠心機 または 野菜水切り器: 1 台
- 96 ウェルプレート対応サーマルサイクラー: 1 台

### 必要な試薬・消耗品

- 1.5mL チューブ: 1 本 / 96 ウェル
- 96 ウェルプレート: 1 枚 / 96 サンプル
- プレートシール: 1 枚 / 96 サンプル
- 5x Q5 Reaction Buffer: 2.5 $\mu$ L / 1 ウェル
- 5x Q5 High GC Enhancer: 2.5 $\mu$ L / 1 ウェル
- 10mM dNTPs: 0.25 $\mu$ L / 1 ウェル
- SPW: 3.25 $\mu$ L / 1 ウェル
- Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (2U/ $\mu$ L): 0.1 $\mu$ L / 1 ウェル
- 8 連チューブ: 1 本 / 1 プレート
- 50 $\mu$ M フォワードインデックスプライマー: 1.68 $\mu$ L / 12 ウェル  $\times$  8 種類
- SPW: 15.1 $\mu$ L / 1 フォワードインデックスプライマー
- 8 連チューブ: 1.5 本 / 1 プレート
- 50 $\mu$ M リバーズインデックスプライマー: 1.2 $\mu$ L / 8 ウェル  $\times$  12 種類
- SPW: 10.8 $\mu$ L / 1 リバーズインデックスプライマー
- PCR 産物: 2 $\mu$ L / 1 サンプル  $\times$  96 サンプル

### 作業手順

1. 冷凍試薬、プライマー、鋳型 DNA 溶液を解凍してボルテックスしてスピンドウン
2. 1.5mL チューブに 5x Q5 Reaction Buffer 2.5 $\mu$ L、5x Q5 High GC Enhancer 2.5 $\mu$ L、10mM dNTPs 0.25 $\mu$ L、SPW 3.25 $\mu$ L を (ウェル数  $\times$  X) 倍入れてボルテックスしてスピンドウン (X は 24 ウェルごとに 1。48 ウェルなら X=2。96 ウェルなら X=4)
3. 8 連チューブ 1 本を用意し、8 ウェルに SPW を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 15.1 $\mu$ L ずつ分注する

4. 50 $\mu$ M フォワードインデックスプライマー 8 種類を 3 の 8 連チューブの各ウェルに加えてボルテックスしてスピンドウン
5. 8 連チューブ 1.5 本を用意し、12 ウェルに SPW を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 10.8 $\mu$ L ずつ分注する
6. 50 $\mu$ M リバースインデックスプライマー 12 種類を 5 の 8 連チューブの各ウェルに加えてボルテックスしてスピンドウン
7. アイソフリーズ PCR ラックに 96 ウェルプレートを置く
8. 2 に Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2U/ $\mu$ L) 0.1 $\mu$ L $\times$ (ウェル数 +X) を加えて転倒混和して、**入れたことがわかるよう目印を付ける**
9. 96 ウェルプレート全体に 8 の混合液を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 8.6 $\mu$ L ずつ分注する
10. 96 ウェルプレートの各列の 8 ウェルにそれぞれ異なる 5 $\mu$ M リバースインデックスプライマーを 12 連 10 $\mu$ L 電動ピペットまたは 20 $\mu$ L 電動ピペットで 1.2 $\mu$ L ずつ分注する
11. 96 ウェルプレートの各行の 12 ウェルにそれぞれ異なる 5 $\mu$ M フォワードインデックスプライマーを 20 $\mu$ L 電動ピペットで 1.2 $\mu$ L ずつ側壁に付けるように分注する
12. 96 ウェルプレートをアイソフリーズラックに乗せたままサーマルサイクラーのある部屋に移動
13. 96 ウェルプレートにプレートシールを漏れない程度に軽く貼ってスピンドウンして容量のずれがないか目視確認してプレートシールを剥がす
14. PCR 産物を冷凍しているなら解凍してスピンドウンしてプレートシールを剥がす
15. PCR 産物 2 $\mu$ L を 12 連 10 $\mu$ L ピペットで気泡が入らないようにリバースピペッティングで加える
16. 96 ウェルプレートにプレートシールをしっかりと貼ってスピンドウンして容量のずれがないか目視確認
17. 96 ウェルプレートをセットせずにサーマルサイクラーのプログラムをスタートさせ、初期変性温度に達したら一時停止する
18. 96 ウェルプレートをセットしてプログラムを再開する
19. 終わったら十分冷めるまで待って、96 ウェルプレートをサーマルサイクラーから取り外す
20. プレートシールを押さえて浮き上がった部分をしっかりと貼り付ける
21. スピンドウンして容量のずれがないか目視確認
22. 冷蔵庫に一時保管 (1 ヶ月以上の長期の場合は冷凍庫へ)

#### PCR プログラム

1. 98°C 3min
2. 98°C 10sec
3. 65°C 20sec (降下速度 0.5°C/sec)
4. 72°C 20sec
5. 2 に戻る (11 回・12 サイクル)
6. 72°C 10min
7. 10°C

Pipetty TLIC01-250 で 20 $\mu$ L 以下の容量の分注を行うと、設定よりもやや多めに出る傾向があります。5~10 $\mu$ L では 0.3 $\mu$ L 程度、10~15 $\mu$ L では 0.2 $\mu$ L 程度、15~20 $\mu$ L では 0.1 $\mu$ L 程度少なめに設定するといいいでしょう。

上記プロトコルでは本来 12.5 $\mu$ L が各ウェルの総容量になりますが、水分が PCR の最中に水蒸気になったり側面に付

着したりするため、0.5 $\mu$ L 多めにしています。

96 ウェルプレートにサーマルサイクラーにセットしてから、中身が設定温度になるまで少し時間がかかるため、初期変性の時間を長めにしています。完了後の冷却温度は 4°C に設定することが多いですが、4°C ではサーマルサイクラーの寿命が縮みやすいので、10°C に設定しています。

### 2.5.13 インデックス付きサンプルをひとまとめにする作業のプロトコル

#### 必要な機材

- 12 連 100 $\mu$ L 電動ピペット Eppendorf Xplorer Plus 4861000791 または Sartorius Picus 735441: 1 本
- 1000 $\mu$ L ピペット: 1 本

#### 必要な試薬・消耗品

- 1.5mL DNA 低吸着チューブ: 1 本 / 1 プレート
- 8 連チューブ: 1.5 本 / 1 プレート

#### 作業手順

1. 8 連チューブ 1.5 本を用意し、ラックに立てておく
2. 12 連 100 $\mu$ L 電動ピペットを用いて 96 ウェルプレート上の同列の 8 ウェルの PCR 産物から 10 $\mu$ L ずつ吸引し、合計 80 $\mu$ L を 1 の 8 連チューブ 1.5 本 (12 ウェル) に入れる
3. 8 連チューブから 1000 $\mu$ L ピペットで各ウェルの溶液を連続的に吸って 1.5mL DNA 低吸着チューブに移す
4. 冷蔵庫に一時保管 (1 ヶ月以上の長期の場合は冷凍庫へ)

### 2.5.14 E-Gel SizeSelect によるサイズ選択

磁気ビーズに目的の長さの DNA を選択的に吸着させることで、プライマーダイマーや dNTP、残ったプライマーなどを除去、濃縮した上で、E-Gel SizeSelect で電気泳動することで目的のサイズの DNA だけを取り出します。磁気ビーズ精製を先に行わないと、回収された DNA が薄すぎたり、誤ってプライマーダイマーのバンドを回収してしまったりします。なお、ここでは磁気ビーズ精製では 300bp 未満の DNA 断片を除去し、300bp 以上の断片を回収すると仮定しています。回収したい DNA サイズが異なる場合は、後述する目安を参考に MagNA 液量を変更する必要があります。

#### 必要な機材

- 20 $\mu$ L 電動ピペット アイカマス・ラボ Pipetty TLIC01-20 または エー・アンド・デイ MPA-20: 1 本
- 200 $\mu$ L 電動ピペット アイカマス・ラボ Pipetty TLIC01-250 または エー・アンド・デイ MPA-200: 1 本

- 8連チューブ用 または 96 ウェルプレート用磁気スタンド: 1 台 (自作方法は A.5 を参照)
- ボルテックスミキサー: 1 台
- invitrogen E-Gel 電気泳動システム: 1 台

#### 必要な試薬・消耗品

- 0.2mL チューブ: 6 本 / 1 サンプル (2 レプリケート)
- MagNA 液 (作成方法は付録 B.4 を参照): 80 $\mu$ L / 1 レプリケート
- ライブラリ溶液: 100 $\mu$ L  $\times$  2 レプリケート  $\times$  最大 3 サンプル
- SPW: 23.5 $\mu$ L / 1 レプリケート
- 70% エタノール: 300 $\mu$ L / 1 レプリケート
- invitrogen E-Gel SizeSelect II 2% プレキャストアガロースゲル: 1 枚 (7 レーンあるので、最大 6 サンプルとラダーが流せる)
- 10X Sample Loading Buffer: 2.5 $\mu$ L / 1 レプリケート (E-Gel SizeSelect II に付属)
- SPW:
- 0.2mL チューブ: 1 本 / 1 ラダーマーカールーン
- DNA ラダーマーカール: 5 $\mu$ L / 1 レーン (専用品である必要はない)

#### 作業手順

1. MagNA 液を 30 分程度放置して室温に戻す
2. MagNA 液を転倒混和して磁気ビーズを均一にする
3. 1 サンプル当たり 0.2mL チューブ 2 本にラベルを振って、MagNA 液を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 80 $\mu$ L ずつ分注する
4. ライブラリ溶液を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 100 $\mu$ L ずつ追加する
5. チューブラックに立ててボルテックス (目視確認して混ざってなければ繰り返す) してスピンドウン
6. 20°C 5 分インキュベート
7. 磁気スタンドに立て、2 分静置する
8. ビーズに触れないよう注意して溶液を 200 $\mu$ L ピペットで吸い取って捨てる
9. 磁気スタンドに立てたまま、1000 $\mu$ L 電動ピペットで 70% エタノールを 150 $\mu$ L ずつ加える
10. エタノールを 200 $\mu$ L ピペットで吸い取って捨てる
11. 磁気スタンドに立てたまま、1000 $\mu$ L 電動ピペットで 70% エタノールを 150 $\mu$ L ずつ加える
12. エタノールを 200 $\mu$ L ピペットで吸い取って捨てる (できるだけ除去)
13. 磁気スタンドから外して 20°C で 3 分インキュベート (磁気ビーズを適度に乾かす。乾かしすぎるとビーズが割れて回収率低下するので注意)
14. SPW を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 23.5 $\mu$ L ずつ加える
15. チューブラックに立ててボルテックス (目視確認して混ざってなければ繰り返す) してスピンドウン
16. サーマルサイクラーにセットして 37°C で 5 分インキュベート
17. 1 サンプル当たり新しい 0.2mL チューブ 2 本およびラダーマーカール用 0.2mL チューブ 1 本に 10X Sample Loading Buffer を 20 $\mu$ L 電動ピペットで 2.5 $\mu$ L ずつ分注する

18. E-Gel 電気泳動システムをセットアップし、プレキャストゲルを開封してセット (コームの取り外しの際にウェルを壊さないように注意)
19. 上段の全ウェルに SPW を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 25 $\mu$ L ずつアプライする
20. 上段の使用しないウェルに SPW を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 25 $\mu$ L ずつアプライする (溢れてもよい)
21. 下段の全ウェルに SPW を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 50 $\mu$ L ずつアプライする (溢れてもよい)
22. SPW 17.5 $\mu$ L と DNA ラダーマーカー 5 $\mu$ L を 17 のチューブに加えてピペッティングし、上段の中央ウェルにアプライする (マーカーを 2 レーン流すなら両端ウェルを使用する)
23. 16 の DNA 溶液 22.5 $\mu$ L を 17 のチューブに加えてピペッティングし、空いている上段のウェルに全量 (25 $\mu$ L) をアプライする (中央部を優先して使用する)
24. E-Gel 電気泳動システムの電源を入れ、SizeSelect 2% プロトコルを選択して泳動時間を適当にセットして泳動を開始する
25. 1 サンプル当たり新しい 0.2mL チューブ 2 本を用意してラベルを振っておく
26. 残り時間が少なくなってきたら、ときどきバックライトを点けてバンドの位置を確認する
27. ターゲットのバンドが基準線に達したら泳動を止めて、下段のウェルの SPW が 30 $\mu$ L 未満まで減っていた場合は SPW を継ぎ足し、30 $\mu$ L 以上ある場合はピペットで吸い出して減らし、泳動を再開する (確実にするには、全て吸い出してから SPW 30 $\mu$ L を入れる)
28. ターゲットのバンドが下段のウェル内に入ったら泳動を止めて、ウェル内の溶液を 0.2mL チューブに回収する
29. ターゲットのバンドが通過してしまった場合は、Reverse E-Gel プロトコルを選択して逆方向に泳動することで、通り過ぎたバンドを下段ウェル内に戻して回収する
30. 0.2mL チューブに回収した DNA 溶液は冷蔵庫に一時保管 (1 週間以上の場合は冷凍庫へ)
31. 使用済みプレキャストゲルは付いていたコームを挿して入っていた袋に戻し、廃棄する

#### 回収したい DNA サイズと MagNA 液の量の目安

200bp 以上	DNA 溶液と等量
250bp 以上	DNA 溶液の 0.9 倍
300bp 以上	DNA 溶液の 0.8 倍
400bp 以上	DNA 溶液の 0.7 倍
500bp 以上	DNA 溶液の 0.65 倍

#### セットする泳動時間の目安

350bp	13 分
400bp	13.5 分
450bp	14 分
500bp	14.5 分
600bp	15.5 分
700bp	16 分

サンプルの回収は複数回行くと濃度が低下しすぎるので、1 回で済ませます。回収した DNA 濃度を上げたい場合は、

最初に磁気ビーズ精製に使用するライブラリ溶液量を増やします。回収する溶液量を増やしたい場合は、レプリケート数を増やして回収した溶液を混合します。

### 2.5.15 アガロースゲル電気泳動とゲルからの DNA 回収によるサイズ選択のプロトコル

磁気ビーズに目的の長さの DNA を選択的に吸着させることで、プライマーダイマーや dNTP、残ったプライマーなどを除去、濃縮した上で、アガロースゲル電気泳動とバンドの切り出し、切り出したゲルからの DNA 回収を行うことで、目的のサイズの DNA だけを取り出します。磁気ビーズ精製を先に行わないと、回収された DNA が薄すぎたり、誤ってプライマーダイマーのバンドを回収してしまったりします。なお、ここでは磁気ビーズ精製では 300bp 未満の DNA 断片を除去し、300bp 以上の断片を回収すると仮定しています。回収したい DNA サイズが異なる場合は、後述する目安を参考に MagNA 液量を変更する必要があります。コンタミネーションを避けるため、一度に複数のライブラリのサイズ選択は行わないようにします。

#### 必要な機材

- 20μL 電動ピペット アイカムス・ラボ Pipetty TLIC01-20 または エー・アンド・デイ MPA-20: 1 本
- 200μL 電動ピペット アイカムス・ラボ Pipetty TLIC01-250 または エー・アンド・デイ MPA-200: 1 本
- 12 連 10μL ピペット: 1 本
- 8 連チューブ用 または 96 ウェルプレート用磁気スタンド: 1 台 (自作方法は A.5 を参照)
- ボルテックスミキサー: 1 台
- プレート遠心機 または 野菜水切り器: 1 台
- ADVANCE Mupid-One: 1 台
- ADVANCE ゲルメーカーセット One-HR: 1 セット (ハーフサイズで使用)
- 300mL ビーカー: 1 個

#### 必要な試薬・消耗品

- 0.2mL チューブ: 6 本 / 1 サンプル (2 レプリケート)
- MagNA 液 (作成方法は付録 B.4 を参照): 80μL / 1 レプリケート
- ライブラリ溶液: 100μL × 2 レプリケート × 最大 1 サンプル
- SPW: 26μL / 1 レプリケート
- 70% エタノール: 300μL / 1 レプリケート
- 1x TAE: 350mL
- 1x TAE: 40mL
- 日本ジェネティクス Midori Green Advance: 2μL
- 日本ジェネティクス FastGene ゲルバンドカッター FG-830: 5 本
- 日本ジェネティクス FastGene Gel/PCR Extraction Kit FG-91302: 5 回分
- ニッポンジーン アガロース XP または 関東化学 アガロース KANTO LM: 1.0g
- New England BioLabs Gel Loading Dye, Purple (6X) (B7024S): 5μL / 1 ライブラリ
- New England BioLabs Quick-Load Purple 50 bp DNA Ladder (N0556S): 10μL / 1 ライブラリ

## 作業手順

1. MagNA 液を 30 分程度放置して室温に戻す
2. MagNA 液を転倒混和して磁気ビーズを均一にする
3. 1 サンプル当たり 0.2mL チューブ 2 本にラベルを振って、MagNA 液を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 80 $\mu$ L ずつ分注する
4. ライブラリ溶液を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 100 $\mu$ L ずつ追加する
5. チューブラックに立ててボルテックス (目視確認して混ざってなければ繰り返す) してスピンドアウン
6. 20°C 5 分インキュベート
7. 磁気スタンドに立て、2 分静置する
8. ビーズに触れないよう注意して溶液を 200 $\mu$ L ピペットで吸い取って捨てる
9. 磁気スタンドに立てたまま、1000 $\mu$ L 電動ピペットで 70% エタノールを 150 $\mu$ L ずつ加える
10. エタノールを 200 $\mu$ L ピペットで吸い取って捨てる
11. 磁気スタンドに立てたまま、1000 $\mu$ L 電動ピペットで 70% エタノールを 150 $\mu$ L ずつ加える
12. エタノールを 200 $\mu$ L ピペットで吸い取って捨てる (できるだけ除去)
13. 磁気スタンドから外して 20°C で 3 分インキュベート (磁気ビーズを適度に乾かす。乾かしすぎるとビーズが割れて回収率低下するので注意)
14. SPW を 200 $\mu$ L 電動ピペットで 26 $\mu$ L ずつ加える
15. チューブラックに立ててボルテックス (目視確認して混ざってなければ繰り返す) してスピンドアウン
16. サーマルサイクラーにセットして 37°C で 5 分インキュベート
17. 1 サンプル当たり新しい 0.2mL チューブ 1 本に 6x ローディングダイを 20 $\mu$ L 電動ピペットで 5 $\mu$ L ずつ分注する
18. 16 の溶液 25 $\mu$ L を 17 に加えてピペッティングして混合する
19. ピーカーに 1x TAE 350mL を量り取って Mupid の泳動層に入れる
20. ゲルメーカーセットから必要なものを選び、電子レンジのそばに配置しておく
21. ピーカーに 1x TAE 25mL とアガロース 1.0g を入れて電子レンジで加熱してよく振って溶かす
22. 再度電子レンジで加熱し、沸騰したら取り出して 1x TAE 15mL を加えて振る
23. Midori Green Advance 2 $\mu$ L を入れてよく混ぜ、すぐにゲルメーカーセットの型に流し込んでコーンを 1 本挿して (26 ウェル側を使用)、ゲルが固まるまで置いておく
24. 完全に固まったゲルからコーンを抜き、泳動槽にセットする
25. 18 を 20 $\mu$ L 電動ピペットで 6 $\mu$ L ずつ 5 つのウェルに 1 つ飛ばしでアプライする (2 レプリケートなので 10 ウェルを使用)
26. ラダーマーカーを 20 $\mu$ L 電動ピペットで 5 $\mu$ L ずつ空ウェルにアプライする
27. 泳動槽の蓋を閉め、極性方向に注意して泳動を開始する (+ 方向に動く)
28. 流れ切らないように注意して泳動を終了し、ラップを引いた青色 LED トランスイルミネーター上で泳動像を確認
29. ゲルバンドカッター 1 本当たり 2 レーンのターゲットバンドを連続して切り取り、1.5mL チューブに入れる
30. 結合バッファー GP1 500 $\mu$ L を加えてボルテックス
31. 56°C でゲルが溶解するまでインキュベート (10~15 分)
32. FastGene GP カラムをコレクションチューブに挿し、ゲル溶解液最大 800 $\mu$ L をカラムに入れ、20°C 6000 $\times$ g で 1 分遠心し、**濾液を捨てる**

33. ゲル溶解液が残っている場合は 32 を繰り返す
34. 洗浄バッファー GP2 600 $\mu$ L をカラムに加え、20°C6000 $\times$ g で 1 分遠心する
35. エタノールを除去するため、20°C20000 $\times$ g で更に 1 分遠心し、**濾液を捨てる**
36. 正式なラベルを振った 1.5mL DNA 低吸着チューブにカラムを移す (カラムに濾液が付着しないよう注意すること)
37. 加温しておいた溶出バッファー GP3 20 $\mu$ L をカラムの中心に加え、56°C で 1 分以上インキュベート (1 サンプルごとにチップ交換)
38. 20°C6000 $\times$ g で 1 分遠心し、**濾液を回収する**
39. -20°C で保管

回収したい DNA サイズと MagNA 液の量の目安

200bp 以上	DNA 溶液と等量
250bp 以上	DNA 溶液の 0.9 倍
300bp 以上	DNA 溶液の 0.8 倍
400bp 以上	DNA 溶液の 0.7 倍
500bp 以上	DNA 溶液の 0.65 倍

回収した DNA 濃度を上げたい場合は、最初に磁気ビーズ精製に使用するライブラリ溶液量を増やします。回収する溶液量を増やしたい場合は、レプリケート数を増やして回収した溶液を混合します。溶出時にバッファーを使用するため、DNA の定量に影響を及ぼす可能性がないとは言いきれませんので注意して下さい。

## 2.6 ライブラリのクオリティチェック

### 2.6.1 Qubit による濃度測定と希釈

従来、Nanodrop などの分光光度計によって DNA の定量を行うことが多かったと思いますが、実はこの方法による測定精度は高くありません。そこで、蛍光色素を用いたより高精度の定量を行います。Qubit はその代表的な機材です。類似品が他社からも出ており、測定精度も大差ありませんので、どの装置を用いていただいても構いません。もちろん、蛍光マイクロプレートリーダーでも構いません。ランニングコストは、Promega の Quantus と QuantiFluor dsDNA System が一番安いと思います。また、Qubit、Quantus とともに、バッファーによる希釈操作が必要ないキットも出ていますので、それらを使用すると手間が多少減ります。

必要な機材

- Qubit Fluorometer: 1 台



## 必要な試薬・消耗品

- Qubit 専用 0.5mL チューブ: 1 本 / 1 サンプル
- 1.5mL チューブ または 2mL チューブ または 5mL チューブ または 15mL 遠沈管: 1 本
- Qubit dsDNA HS Reagent: 1 $\mu$ L / 1 サンプル
- Qubit dsDNA HS Buffer: 199 $\mu$ L / 1 サンプル
- Qubit dsDNA HS Standard #1: 10 $\mu$ L
- Qubit dsDNA HS Standard #2: 10 $\mu$ L
- ライブラリ溶液: 2 $\mu$ L

## 作業手順

1. 冷蔵しているスタンダードを室温に戻す
2. サンプル数+2 本 (スタンダード用) の専用チューブをラックに立てて、キャップにラベルを振る
3. 専用チューブにスタンダードを 10 $\mu$ L ずつ、ライブラリ溶液を 2 $\mu$ L ずつ入れる
4. Qubit dsDNA HS Reagent 1 $\mu$ L と Qubit dsDNA HS Buffer 199 $\mu$ L を測定サンプル数+2 倍量チューブに入れてボルテックス
5. スタンダードの入ったチューブに 4 の混合液を 190 $\mu$ L 入れてピペッティング
6. ライブラリ溶液の入った専用チューブに 4 の混合液を 198 $\mu$ L 入れてピペッティング
7. 20°C で 5 分インキュベート
8. Qubit の電源を入れて dsDNA High Sensitivity を選択
9. スタンダードを測定する
10. サンプル液量を 2 $\mu$ L に設定
11. ライブラリを測定する
12. 9 に戻る (2 回戻る・3 回測定)

Qubit での測定値  $x$  ng/ $\mu$ L ( $\mu$ g/mL でも同じ) と、期待される DNA 断片長  $y$  bp を以下の式に代入することでモル濃度を計算します。

$$\text{Concentration (nM)} = \frac{1000000 \cdot x}{660 \cdot y}$$

この算出方法は、イルミナが公式に提供しているウェブページ (<https://support.illumina.com/help/nanomolar-conversion/nanomolar-conversion.htm>) でも使用されています。

以下の式を使うこともあるようです。筆者はこちらを使用しています。

$$\text{Concentration (nM)} = \frac{1000000 \cdot x}{607.4 \cdot y + 157.9}$$

なお、期待される DNA 断片長は、以下の式で求められます。アダプター配列が Nextera 型でも TruSeq 型でも同じです。

$$\begin{aligned}\text{Final fragment length (bp)} &= \text{Insert length} \\ &+ \text{Mean length of forward adapter primer} \\ &+ \text{Mean length of reverse adapter primer} \\ &+ 70\end{aligned}$$

インサート長は、Primer-BLAST <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> か ecoPCR (Bellemain *et al.*, 2010) で推定できます。ここでは Primer-BLAST を使う方法を説明します。Primer-BLAST のページで鋳型になる塩基配列 (またはそのアクセッション番号) を「PCR Template」の「Enter accession, gi, or FASTA sequence」に、アダプターや N を除いたプライマー配列を「Primer Parameters」の「Use my own forward primer」と「Use my own reverse primer」に入力し、「Primer Pair Specificity Checking Parameters」の「Database」を「nr」に、「Organism」を適当な分類群 (学名や一般名を入力すれば候補が出ます) に設定して「Get Primers」を押して結果を待ちます。結果のページ内の「Detailed primer reports」に「Products on potentially unintended templates」という欄があり、1000 件のマッチがリストアップされています。このリスト内に「product length」が載っていますので、この数値を集めて平均値を使用します。この「product length」には指定したプライマーのアニールする部分が含まれていますので、プライマーの長さを引くことでインサート長になります。入力したプライマーは鋳型に完全マッチしていなければならず、プライマーに縮重塩基は使用できません。プライマーに縮重塩基が含まれている場合、鋳型配列のアニールする領域を取り出して代わりに使用します。鋳型配列には、確実にマッチするとわかっている配列を使用します。例えば、MiFish であれば魚の 12S rRNA 領域の配列や、ミトゲノム配列を使えばいいでしょう。なお、ecoPCR を使用すれば、縮重塩基にも対応していますし、1000 件以上のヒットも全て得ることができます。

計算したモル濃度に基づいて、ライブラリ溶液を 4nM、または 2nM、または 1nM に希釈し、シーケンスに使用します。

## 2.6.2 アガロースゲル電気泳動のプロトコル (高分解能版)

通常、シーケンス用ライブラリは Agilent 社の Bioanalyzer などの高感度・高分解能電気泳動装置を用いて DNA 断片長を推定し、期待通りの長さになっているかどうかを確認します。しかし、必ずしも Bioanalyzer を使用可能な環境の方ばかりではないでしょう。そこで、Bioanalyzer が使用できない場合、大型ゲルのアガロースゲル電気泳動でライブラリの断片長を推定します。DNA 断片長が期待通りでない場合、どこかの段階で失敗している可能性があります。

### 必要な機材

- 20μL 電動ピペット アイカムス・ラボ Pipetty TLIC01-20 または エー・アンド・デイ MPA-20: 1 本
- 10μL ピペット: 1 本
- ADVANCE Mupid-One: 1 台
- ADVANCE ゲルメーカーセット One-HR: 1 セット
- 300mL ビーカー: 1 個

## 必要な試薬・消耗品

- 0.2mL チューブ: 1 本 / 1 ライブラリ
- 1x TAE: 350mL
- 1x TAE: 80mL
- 日本ジェネティクス Midori Green Advance: 4μL
- ニッポンジーン アガロース S または 関東化学 アガロース KANTO S または 理科研 STAR Agarose Powder: 1.6g
- ライブラリ溶液: 5μL
- New England BioLabs Gel Loading Dye, Purple (6X) (B7024S): 1μL / 1 ライブラリ
- New England BioLabs Quick-Load Purple 50 bp DNA Ladder (N0556S): 10μL / 1 ライブラリ

## 作業手順

1. ビーカーに 1x TAE 350mL を量り取って Mupid の泳動層に入れる
2. ゲルメーカーセットから必要なものを選び、電子レンジのそばに配置しておく
3. ビーカーに 1x TAE 50mL とアガロース 1.6g を入れて電子レンジで加熱してよく振って溶かす
4. 再度電子レンジで加熱し、沸騰したら取り出して 1x TAE 30mL を加えて振る
5. Midori Green Advance 4μL を入れてよく混ぜ、すぐにゲルメーカーセットの型に流し込んでコームを 1 本挿して (26 ウェル側を使用)、ゲルが固まるまで置いておく
6. 完全に固まったゲルからコームを抜き、泳動槽にセットする
7. 0.2mL チューブに 6x ローディングダイ 1μL を取り、ライブラリ溶液 5μL を加えてピペティングし、全量をゲルにアプライする (パラフィルム上でやっても構わない)
8. ラダーマーカーを 20μL 電動ピペットで 5μL ずつ、ライブラリ溶液をアプライしたウェルの両隣のウェルにアプライする
9. 泳動槽の蓋を閉め、極性方向に注意して泳動を開始する (+ 方向に動く)
10. 流れ切らないように注意して泳動を終了し、ラップを引いた UV トランスイルミネーターで泳動像を確認する

分解能がさほど必要ない場合は、半分のサイズのゲルを使用して下さい。分解能をさらに上げたい場合は、低分子用アガロースをより高濃度で使用して下さい。

E-Gel やアガロースゲルからの切り出しでサイズ選択した時点で DNA 断片長はわかっているじゃないか、と考えるならば、この処理は不要です。しかし、E-Gel でのサイズ選択は完全ではなく、意外に短い断片や長い断片も残っていることがしばしばあります。また、E-Gel では同じサイズの DNA 断片でもかなり泳動速度がばらつくため、ラダーマーカーと比較することでバンドの断片長を推定しても、間違っている可能性があります。シーケンス用試薬は高価で、無駄にすると経済的な痛みが大きいですから、念の為 DNA 断片長を確認しておくことを推奨します。

この方法では感度は Bioanalyzer に比べてずっと低いので、DNA の濃度が低い場合は視認できない可能性があります。また、消費する液量も多いので、十分な液量がない場合は実施できない可能性があります。そのような場合、以下のプライマーを用いた PCR を行い、その PCR 産物を電気泳動することで長さの確認が可能です。

- Forward: AATGATACGGCGACCACCGA
- Reverse: CAAGCAGAAGACGGCATACGA

PCR にはライブラリ溶液を 1 $\mu$ L 使用し (もっと少なくても構いません)、20 サイクル以上の増幅を行って下さい。アニーリング温度は上記の配列に基づいて計算して下さい。使用する酵素は何でも構いません。当然ですが、Bioanalyzer があればこんな面倒な作業は必要ありません。Bioanalyzer 使用時のプロトコルは Agilent 公式サイトをご参照願います。

## 2.7 MiSeq によるシーケンス

### 必要な機材

- 

### 必要な試薬・消耗品

- 

### 作業手順

- 1.

## 引用文献

- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., and Kauserud, H. 2010. ITS as an Environmental DNA Barcode for Fungi: An in Silico Approach Reveals Potential PCR Biases. *BMC Microbiology* **10**: 189, doi: 10.1186/1471-2180-10-189.
- De Wit, P., Pespeni, M. H., Ladner, J. T., Barshis, D. J., Seneca, F., Jaris, H., Therkildsen, N. O., Morikawa, M., and Palumbi, S. R. 2012. The Simple Fool's Guide to Population Genomics via RNA-Seq: An Introduction to High-Throughput Sequencing Data Analysis. *Molecular Ecology Resources* **12**: 1058-1067, doi: 10.1111/1755-0998.12003.
- Hosomichi, K., Jinam, T. A., Mitsunaga, S., Nakaoka, H., and Inoue, I. 2013. Phase-Defined Complete Sequencing of the HLA Genes by next-Generation Sequencing. *BMC Genomics* **14**: 355, doi: 10.1186/1471-2164-14-355.
- Hosomichi, K., Mitsunaga, S., Nagasaki, H., and Inoue, I. 2014. A Bead-Based Normalization for Uniform Sequencing Depth (BeNUS) Protocol for Multi-Samples Sequencing Exemplified by HLA-B. *BMC Genomics* **15**: 645, doi: 10.1186/1471-2164-15-645.
- Ivanova, N. V., Dewaard, J. R., and Hebert, P. D. N. 2006. An Inexpensive, Automation-Friendly Protocol for Recovering High-Quality DNA. *Molecular Ecology Notes* **6**: 998-1002, doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01428.x.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., and 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**: 150088, doi: 10.1098/rsos.150088.
- Miya, M., Minamoto, T., Yamanaka, H., Oka, S.-i., Sato, K., Yamamoto, S., Sado, T., and Doi, H. 2016. Use of a Filter Cartridge for Filtration of Water Samples and Extraction of Environmental DNA. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*: e54741, doi: 10.3791/54741.
- Potapov, V. and Ong, J. L. 2017. Examining Sources of Error in PCR by Single-Molecule Sequencing. *PLOS ONE* **12**: e0169774, doi: 10.1371/journal.pone.0169774.
- Rohland, N. and Reich, D. 2012. Cost-Effective, High-Throughput DNA Sequencing Libraries for Multiplexed Target Capture. *Genome Research* **22**: 939-946, doi: 10.1101/gr.128124.111.
- Speicher, N. 2017. Storing Oligos: 7 Things You Should Know. URL: <https://sg.idtdna.com/pages/education/decoded/article/storing-oligos-7-things-you-should-know>.
- Stevens, J. L., Jackson, R. L., and Olson, J. B. 2013. Slowing PCR Ramp Speed Reduces Chimera Formation from Environmental Samples. *Journal of Microbiological Methods* **93**: 203-205, doi: 10.1016/j.mimet.2013.03.013.
- Sze, M. A. and Schloss, P. D. 2019. The Impact of DNA Polymerase and Number of Rounds of Amplification in PCR on 16S rRNA Gene Sequence Data. *mSphere* **4**: e00163-19, doi: 10.1128/mSphere.00163-19.
- Takada-Hoshino, Y. and Matsumoto, N. 2004. An Improved DNA Extraction Method Using Skim Milk from Soils That Strongly Adsorb DNA. *Microbes and Environments* **19**: 13-19, doi: 10.1264/jsme2.19.13.
- Ushio, M. 2019. Use of a Filter Cartridge Combined with Intra-Cartridge Bead-Beating Improves Detection of Microbial

- DNA from Water Samples. *Methods in Ecology and Evolution* **0**, doi: 10.1111/2041-210X.13204.
- Wang, Y., Nagaoka, K., Hayatsu, M., Sakai, Y., Tago, K., Asakawa, S., and Fujii, T. 2012. A Novel Method for RNA Extraction from Andosols Using Casein and Its Application to amoA Gene Expression Study in Soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **96**: 793-802, doi: 10.1007/s00253-012-4342-3.
- Yamanaka, H., Minamoto, T., Matsuura, J., Sakurai, S., Tsuji, S., Motozawa, H., Hongo, M., Sogo, Y., Kakimi, N., Teramura, I., Sugita, M., Baba, M., and Kondo, A. 2017. A Simple Method for Preserving Environmental DNA in Water Samples at Ambient Temperature by Addition of Cationic Surfactant. *Limnology* **18**: 233-241, doi: 10.1007/s10201-016-0508-5.

## 付録 A

# 使用機材の自作

### A.1 漂白剤抜き器の作成

#### 必要な機材

- 電動ドリル: 1 台
- ドリルビット 22mm: 1 本
- ドリルビット 10mm: 1 本
- モンキーレンチ (先端がベントしているものが使いやすい): 1 本

#### 必要な部材

- アスベル ユニックス キッチンボックス S-70 または 岩崎工業 ラストロ ジャンボケースロック式 B-893: 1 個
- アラム PVC ニップル: 1 個
  - ホース内径 9~10mm 2009-21
  - ホース内径 12mm 2009-22
  - ホース内径 15mm 2009-23
  - ホース内径 19mm 2009-24
  - ホース内径 25mm 2009-25
- アラム PVC ナット 2009-31: 1 個
- アラム PVC ニップル・ナット用パッキン シリコンゴム 10 個入 2009-41: 1 袋 (1 袋 10 個のうちの 2 個)

#### 作業手順

1. コンテナのフタを外し、短辺の中央から 10cm の場所に 22mm の穴を開ける
2. 穴を開けたのと反対側の端に 10mm の穴を 10mm 間隔で 7 つ開ける
3. 22mm の穴を利用して、容器の内側に PVC ナットとパッキン、容器の外側に PVC ニップルとパッキンを取り付けてネジを締める

使用時は中に漂白対象物を入れて、蛇口に繋げたホースをニップルに接続して水道水を勢いよく注ぐ (圧が上がりすぎないように注意)。

## A.2 車載用吸引ポンプユニットの作成

### 必要な機材

- 電装圧着工具 (電工ペンチ): 1 本
- ハサミ: 1 本
- カッターナイフ: 1 本
- 電動ドリル: 1 台
- ドリルビット 7mm: 1 本

### 必要な部材

- エーモン工業 電源プラグ 1537: 1 個
- エーモン工業 ギボシ端子セット 8 セット入 1151: 1 パック (1 パック 8 セット中の 4 セット)
- エーモン工業 ダブルコード 1.25sq 6m 1182: 1 巻
- 日東工器 真空ポンプ DP0410-X1 DC12V: 1 台
- アソー エースニップル PT1/8 ネジ 7mm ニップル HN-7107: 1 個
- アズワン シリコンチューブ 内径 6mm 外径 12mm 長さ 1m (6-586-23-01): 1 本
- アソー エースニップル PT3/8 ネジ 7mm ニップル HN-7307: 2 個
- モノタロウ ねじ込みチーズ ステンレス製 PT3/8 ネジ (07334205): 1 個
- モノタロウ ねじ込みブッシング ステンレス製 PT3/8 x 1/4 ネジ (07334442): 1 個
- 右下精器製造 小型真空計 AT1/4Rx50x-0.1MPa: 1 個
- 岩崎工業 ラストロ キーパー B-322: 1 個
- PTFE シールテープ: 1 巻

### 作業手順

1. 電源プラグとダブルコードをギボシ端子で接続する (+と-を間違えないよう注意する)
2. 真空ポンプのコードのうち、赤を+に、黒を-になるようにダブルコードをギボシ端子で接続する
3. HN-7107 のネジ部分にシールテープを巻き、真空ポンプの吸込口 (電源コードから離れている方) に取り付ける
4. HN-7107 に 15cm 程度に切ったシリコンチューブを取り付ける
5. 真空ポンプを電源コード接続端子が短辺側になるよう B-322 に入れる
6. 真空ポンプのコードが引き出せる隙間を B-322 の短辺に切り込みを入れる
7. ねじ込みチーズの両端にシールテープを巻いた HN-7307 を取り付ける
8. ねじ込みチーズの中央にシールテープを巻いたねじ込みブッシングを取り付ける
9. ねじ込みブッシングにシールテープを巻いた真空計を取り付ける



10. B-322 の真空ポンプから遠い側に直径 7mm の穴を開ける
11. ねじ込みチーズの一方のニップルを真空ポンプに繋がっているシリコンチューブに接続し、もう一方を B-322 の穴に通す

収納時は電源コードは B-322 内に収められます。使用時は切り込みからコードを出すようにします。ただし、ポンプが発熱するので使用時はフタは乗せる程度で、しっかり閉じないようにして下さい。中の空間には、サンプリングに使用するハサミやライター、ピンセットが収納できます。シガーソケット用プラグに DC12V を供給できる AC アダプタを使用すれば、AC 電源でも動作可能です。

## A.3 吸引濾過装置の作成

### 必要な機材

- 電動ドリル: 1 台
- ドリルビット 21mm: 1 本
- ドリルビット 5mm: 1 本

### 必要な部材

- 光 ポリカ中空ボード 450 x 600 x 4mm KTP6044W-1: 1 枚
- カクダイ ヘッダー 4 分岐 682-013-4 または 三栄水栓製作所 ヘッダー 4 分岐 T671N-4-20: 1 個
- モノタロウ ねじ込みブッシング ステンレス製 PT3/4 x 1/2 ネジ (07334485): 2 個
- アソー エースニップル PT3/8 ネジ 7mm ニップル HN-7307: 6 個
- アソー エースボール ストレート 外・内ネジ型 PT1/2 x PF3/8 ネジ BM-2043: 6 個
- アイシス ルアーフィッティング VRM606: 4 個
- アロン化成 TS チーズ 呼び径 13: 4 個
- アロン化成 TS 給水栓用ソケット 呼び径 13: 4 個
- アロン化成 TS バルブソケット 呼び径 13: 4 個
- アロン化成 塩ビパイプ VP 1m 呼び径 13: 1 本
- モノタロウ リピートバンド 耐候タイプ 幅 4.8mm 長さ 301mm 100 本入 R280-BK: 1 袋 (1 袋 100 本のうち 4 本)
- モノタロウ ケーブルタイ 耐候タイプ 幅 4.8mm 長さ 288mm 100 本入 290-BK: 1 袋 (1 袋 100 本のうち 10 本)
- アズワン シリコンチューブ 内径 6mm 外径 12mm 長さ 1m (6-586-23-01): 1 本

### 作業手順

1. あとでかく

## A.4 プラスチックバッグと濾過フィルターユニットの接続アダプターの作成

### 必要な機材

- 電動ドリル または ボール盤 または 旋盤: 1 台
- ドリルビット 13mm: 1 本 (アズワン FH-PP47 および ADVANTEC PP-47 用)
- ドリルビット 7mm: 1 本 (Sterivex 用)
- 井上工具 コーキングヘラ 5mm 15004: 1 本
- 5mL 程度のシリンジ: 1 本
- 内径 1~1.5mm のノズル (ニードル): 1 本

### 必要な部材

- プラスチックバッグ DP16-TNxxxx のキャップ: 1 個
- 樹脂カプラプラグ ジョブラックス JF-02W または フローバル JF-02POM または フローバル JF-02PP: 1 個 (アズワン FH-PP47 および ADVANTEC PP-47 用)
- アイシス ルアーフィッティング VRM606: 1 個 (Sterivex 用)
- セメダイン PPX セット: 1 セット
- コニシ ウルトラ多用途 SU プレミアムソフト: 1 本

### 作業手順

1. 樹脂カプラプラグ (アズワン FH-PP47 および ADVANTEC PP-47 用) の O リングは取り外して捨てる
2. 樹脂カプラプラグ (アズワン FH-PP47 および ADVANTEC PP-47 用) またはルアーフィッティング (Sterivex 用) のクビを 2mm 残して切断する
3. プラスチックバッグのキャップ中心に 13mm (アズワン FH-PP47 および ADVANTEC PP-47 用) または 7mm (Sterivex 用) の穴を開ける
4. プラスチックバッグのキャップと樹脂カプラプラグ (アズワン FH-PP47 および ADVANTEC PP-47 用) またはルアーフィッティング (Sterivex 用) を PPX セットで接着する
5. プラスチックバッグのキャップ内側にシリンジでウルトラ多用途 SU を塗り、コーキングヘラで広げて均す
6. 接着面外側にもウルトラ多用途 SU を塗って目張りをする

ポリプロピレンの接着は、プライマーを併用したシアノアクリレート系接着剤が最も強固に付きますが、水に弱いので、ウレタン系接着剤で目張りすることで補います。接着面はさほど強固ではないので、負荷がかからないように作業中は注意します。

## A.5 96 ウェルプレート用磁気スタンドの自作

### 必要な機材

- 電動ドリル: 1 台
- ドリルビット 6mm: 1 本

### 必要な部材

- イナ・オプティカ R-02-96 PCR チューブ用ラック: 1 個
- 二六製作所 NE051 ネオジム  $\Phi$  6×10(N35): 24 個
- シアノアクリレート系瞬間接着剤: 1 本

### 作業手順

1. あとでかく

## A.6 青色 LED トランスイルミネーターの自作

### 必要な機材

- はんだごて: 1 本
- 電動ドリル: 1 台
- ホールソー 75mm: 1 本
- ドリルビット 14mm: 1 本
- ドリルビット 5mm: 1 本
- ドリルビット 4mm: 1 本
- ドリルビット 面取りカッター (皿取り錐) 8~12mm: 1 本
- 電装圧着工具 (電工ペンチ): 1 本
- ニッパー: 1 本
- カッターナイフ: 1 本
- グルーガン: 1 本

### 必要な部材

- Anthin AC アダプター 12V 3.8A API345-1238: 1 個

- エルパラ 調光器 DC12-24V 30A: 1 個
- エルパラ DC ジャックケーブル: 1 本
- エルパラ 5050 テープ LED 60LED/m 非防水 青色 1m: 3 本
- エーモン工業 ダブルコード 0.2sq 10m 2804: 1 巻
- エーモン工業 ダブルコード 0.75sq 6m M272: 1 巻
- エーモン工業 ギボシ端子セット 20 セット入 2970: 1 パック (1 パック 20 セット中の 10 セット)
- エーモン工業 ギボシ端子セット (ダブル) 6 セット入 2971: 1 パック (1 パック 6 セット中の 3 セット)
- エーモン工業 平型端子 (メスセット) 250 型 20 セット入 1136: 1 パック (1 パック 20 セット中の 2 セット)
- エーモン工業 トグルスイッチ ON-OFF DC12V・8A 3203: 1 個
- 未来工業 防水プルボックス PVP-2010AM: 1 個
- モノタロウ アクリル板 (透明) 厚さ 4mm 4×200×200 45547607: 1 枚
- 3M スコッチカル ディフューザーフィルム 3635-30: 200mm×200mm 分
- 光 アクリル板 (ホワイ) A068-2US: 1 枚
- AINEX 80mm 角ファン CFZ-8015SA: 1 個
- KAUMO PC ケースファン防塵フィルター ホワイト 8cm 5 枚入 KM-FF348: 1 枚
- ダイドーハント 超低頭 小ねじセット 吊パック ステンレス M4×10mm 4 セット入: 1 パック
- ダイドーハント 超低頭 小ねじセット デジタルパック ステンレス M4×12mm 8 セット入: 1 パック (1 パックのうち 6 セット)
- 熱収縮チューブ: 適量
- はんだ: 適量

## 作業手順

1. AC アダプターにテープ LED を接続して点灯テストする
2. テープ LED から両端にはんだ付けされている DC ジャック・DC プラグケーブルを取り外して廃棄する
3. テープ LED を切断して 150mm 長のものを 18 本作成する
4. 白アクリル板上に LED チップが等間隔になるよう 18 本の 150mm 長 LED テープを貼る (9 本の電源端子が一方の長辺側に、残り 9 本の電源端子がもう一方の長辺側に出よう配置)
5. 0.2sq ダブルコードを切断して 100mm 長を 10 本、150mm 長を 8 本作成し、プラスとマイナスのケーブルを分離する
6. 5 本の 100mm 長プラスケーブル、4 本の 150mm 長プラスケーブルを束ねてオスギボシ端子を取り付ける (カバーは付けづらいので代わりに熱収縮チューブを用いる)
7. マイナスケーブルも同様に束ねて接続する
8. 同じものをもう 1 セット作成する
9. 9 分岐ケーブルと繋がっている 18 本のケーブルを 9 本のテープ LED の電源端子にはんだ付けする
10. もう 1 本の 9 分岐ケーブルも同様に残り 9 本のテープ LED の電源端子にはんだ付けする
11. プルボックスの側面に、80mm 角ファン固定用の直径 4mm 穴 4 つと、吸気用の直径 75mm 穴を空ける
12. 同じ面の隅の底付近に DC ジャック設置用の直径 14mm の穴を 1 つ、トグルスイッチ設置用の直径 12mm 穴を 1 つ、排気用の穴をいくつか空ける
13. プルボックスの反対面に、調光器固定用の直径 4mm 穴 4 つと、底付近に調光器に接続するケーブル用の直径 5mm 穴 2 つを空ける

14. プールボックスの残りの 2 つの側面に、白アクリル板を 30mm 程度の高さで水平に保持できるように、白アクリル板固定用のネジを通す直径 4mm 穴を 6 つ空ける (一方に△型に 3 つ、もう一方に▽型に 3 つ)
15. 80mm 角ファンのケーブルを切って 3 ピンコネクタを外す
16. 200mm 長の 0.75sq ダブルコードを 2 本に分け、赤ケーブルは 80mm 角ファンの赤ケーブルと束ねてメス平型端子を付ける
17. 80mm 角ファンの黒ケーブルにオスギボシ端子を付ける
18. 200mm 長の 0.75sq 黒ケーブルにダブルメスギボシ端子を付ける
19. DC ジャックケーブルを適当な長さに切って赤ケーブルにメス平型端子、黒ケーブルにオスギボシ端子を付ける
20. DC ジャックケーブルの DC ジャックをプールボックスの穴にグルーガンで接着する
21. トグルスイッチをプールボックスに固定する
22. DC ジャックケーブルの赤ケーブルのメス平型端子をトグルスイッチに接続し、黒ケーブルのオスギボシ端子は 0.75sq 黒ケーブルのダブルメスギボシ端子に接続する
23. 赤ケーブルに付けたメス平型端子をトグルスイッチのもう一方の端子に接続する
24. 80mm 角ファンと防塵フィルターをプールボックスの外側に吸気するようにファン付属のネジで固定する
25. 調光器を M4×10mm ネジで固定する
26. 0.75sq の赤黒ケーブルを反対側の直径 5mm の穴から出して、余分なケーブルは切断して調光器の入力端子に接続する
27. 調光器の出力端子に新しい 200mm 長の 0.75sq ダブルコードを接続し、もう一つの直径 5mm 穴からプールボックス内に引き込む
28. 0.75sq ダブルコードにダブルメスギボシ端子を付ける
29. 新しい 100mm 長の 0.75sq ダブルコードを 2 本に分け、一方にオスギボシ端子、もう一方にメスギボシ端子を付ける
30. 同じものをもう 1 セット作成する
31. ダブルメスギボシ端子に 100mm 長の 0.75sq コードのオスギボシ端子を接続し、反対側のメスギボシ端子には 9 分岐ケーブルを接続する
32. M4×12mm ネジをプールボックス側面に通してナット止めし、テープ LED を載せた白アクリル板を固定する
33. 透明アクリル板の四隅にネジ止め用の直径 4mm の穴を空け、面取りカッターで穴をテーパ状にする
34. 透明アクリル板の穴が小さい側にディフューザーフィルムを貼り付け、ネジ止め用穴部分をカッターナイフで切り取る
35. ディフューザーフィルムが内側になるよう透明アクリル板をネジ止めする
36. AC アダプターを接続してトグルスイッチを ON にし、調光器を回して点灯テストする

## A.7 青色 LED トランスイルミネーター用フィルターカバーの自作

### 必要な機材

- 電動ドリル: 1 台
- ドリルビット 4mm: 1 本
- カッターナイフ: 1 本

### 必要な部材

- モノタロウ アクリル板 (透明) 厚さ 4mm 4×200×200 45547607: 1 枚
- LEE Filters カラーフィルター 舞台版 610mm×450mm #767 OKLAHOMA YELLOW: 1 枚
- 日東工業 HJ-3160W 耐熱透明性 両面テープ 幅 20mm×長さ 20m: 1 本
- スガツネ ディテントトルクヒンジ HG-DTA 型 HG-DTA4-R 170-026-457: 1 個
- スガツネ ディテントトルクヒンジ HG-DTA 型 HG-DTA4-L 170-026-458: 1 個
- ダイドーハント 超低頭 小ねじセット 吊パック ステンレス M4×10mm 4 セット入: 1 パック

### 作業手順

1. アクリル板の 4 辺に 10mm はみ出すように両面テープを貼ってから、カッターナイフではみ出した部分を切り落とす
2. 両面テープの剥離紙を剥がしてカラーフィルターを貼り、カッターナイフではみ出した部分を切り落とす
3. トルクヒンジをアクリル板の 1 辺の両端に付けるための直径 4mm 穴を空ける
4. M4×10mm ネジでアクリル板にトルクヒンジを固定してフィルターカバーの完成
5. 青色 LED トランスイルミネーターの天板を固定しているネジのうち、前側の 2 本を抜いて、フィルターカバーのトルクヒンジを共締めして固定する

#767 OKLAHOMA YELLOW は、520nm 以下の光を遮断するフィルターですが、500～520nm の光も多少透過します。そのため、LED や蛍光色素によってはバックグラウンドが高くなる可能性があります。そのような場合は、540nm 以下の光を遮断できる#768 EGG YOLK YELLOW を使用するとコントラストが改善する可能性があります。

このカバーを通して蛍光を観察するには、部屋の照明を落とす必要があります。後述するゲル撮影装置内にトランスイルミネーターを設置すれば、暗幕または暗箱内で蛍光を観察できます。

## A.8 ゲル撮影装置の自作その 1

### 必要な部材

- HOYA HMC Filter Y52 49mm: 1 枚
- マルミ光機 ステップアップリング 37mm→49mm 900935: 1 個
- Panasonic LUMIX DC-GF90W-K または DC-GF10W-K: 1 台
- Panasonic DC カプラー DMW-DCC15A: 1 個
- Panasonic AC アダプター DMW-AC10: 1 個
- SMALLRIG 15mm ロッド 1.5 インチ: 1 個
- LPL コピースタンド CS-A4: 1 台
- Belca テレビ上ラックミニ 伸縮タイプ TV-MX: 1 台
- UTEBIT ポリエステル暗幕 1.8×2.8m: 1 枚

### 作業手順

1. カメラに 12-32mm/F3.5-5.6 レンズを取り付け、鏡筒を回してレンズを繰り出し、フィルターをステップアップリングを介してレンズの前に取り付ける
2. カメラに DC カプラーと AC アダプターを取り付ける
3. 15mm ロッドを介してコピースタンドにカメラを取り付ける
4. テレビ上ラックの下にコピースタンドを置く
5. 全体を暗幕で覆い、付属のクリップで固定する

Y52 は、520nm 以下の光を遮断するフィルターですが、500～520nm の光も多少透過します。そのため、LED や蛍光色素によってはバックグラウンドが高くなる可能性があります。そのような場合は、530nm 以下の光を遮断できる W-O530、540nm 以下の光を遮断できる O54 を使用するとコントラストが改善する可能性があります。ただし、これらのフィルターはマルチコートされたものが販売されていないようなので、表面の反射で少し光をロスしてしまうかもしれません。

撮影はスマートフォンとカメラを Wi-Fi で接続し、スマートフォンのアプリから操作して行います。

レンズの光学手ブレ補正は無効化した方がいいでしょう。充電が面倒でなければ、DC カプラーと AC アダプターを使用せず、バッテリーを用いても問題ありません。

## A.9 ゲル撮影装置の自作その 2

### 必要な機材

- 電動ドリル: 1 台
- ホールソー 45mm: 1 本
- ドリルビット 6mm: 1 本
- センターポンチ: 1 本
- ホットナイフ: 1 本
- カッターナイフ: 1 本

### 必要な部材

- HOYA HMC Filter Y52 49mm: 1 枚
- マルミ光機 ステップアップリング 37mm→49mm 900935: 1 個
- Panasonic LUMIX DC-GF90W-K または DC-GF10W-K: 1 台
- Panasonic DC カプラー DMW-DCC15A: 1 個
- Panasonic AC アダプター DMW-AC10: 1 個
- 光塩ビ板 黒 2×300×450mm EB342-7: 4 枚

- 光塩ビ板 黒 2×300×300mm EB332-7: 1 枚
- アズワン 三角接着補強棒 塩ビ 3×3×1000 6-615-01: 3 本
- アクリサンデー サンデーシート 硬質塩ビ板用接着剤 25mL 注射器付: 1 個
- エーモン 結束テープ 25m 2958: 適量
- 仮止め用テープ (養生テープやマスキングテープでよい): 適量

## 作業手順

1. 三角接着補強棒を切断し、445mm 長を 4 本と 250mm 長を 4 本用意する
2. EB332-7 の面の中央にセンターポンチを打つ
3. EB332-7 の面の中央にドリルビットで 6mm の下穴を空ける (ホールソーの中心ドリル径が異なる場合は合わせる)
4. EB332-7 の面の中央にホールソーで 45mm の穴を空ける
5. 穴のバリをカッターナイフで取ってきれいにする
6. 平らな机の上で、4 枚の EB342-7 の長辺どうしが付くようにできるだけ隙間なく仮止める
7. 仮止めた 4 枚の EB342-7 を上方から見て、菱形ではなくできるだけ正方形になるよう調整する
8. 仮止めた 4 枚の EB342-7 の内側の 4 隅に、445mm の三角接着補強棒を当てながら接着剤を注入する (溶剤タイプなので、塩ビが溶けてすぐに接着される)
9. 接着した 4 枚の EB342-7 を上方から見て、菱形ではなくできるだけ正方形になるよう再度調整する
10. 接着した 4 枚の EB342-7 の上に、穴を空けてある EB332-7 を載せて、できるだけ隙間なく接するよう調整する
11. 4 枚の EB342-7 と上に載せた EB332-7 との接触している部位に接着剤を注入する
12. 上下反転させ、4 枚の EB342-7 と EB332-7 との接触部位 4 箇所、内側から 250mm の三角接着補強棒を当てながら接着剤を注入する
13. 再度上下反転させ、4 枚の EB342-7 と上に載せた EB332-7 との接触している部位に接着剤を再度注入して、黒い塩ビを溶かして隙間を埋める
14. 1 枚の EB342-7 の机に接する辺に、ホットナイフでトランスイルミネーターの電源コードを引き出すための切れ込みを入れる
15. 仮止めテープを剥がしてから全ての辺に結束テープを貼ることで暗箱の完成
16. カメラに 12-32mm/F3.5-5.6 レンズを取り付け、鏡筒を回してレンズを繰り出し、45mm の穴から先端を突き出すように暗箱に載せる
17. フィルターをステップアップリングを介してレンズの前に取り付ける
18. カメラに DC カプラーと AC アダプターを取り付ける

Y52 は、520nm 以下の光を遮断するフィルターですが、500～520nm の光も多少透過します。そのため、LED や蛍光色素によってはバックグラウンドが高くなる可能性があります。そのような場合は、530nm 以下の光を遮断できる W-O530、540nm 以下の光を遮断できる O54 を使用するとコントラストが改善する可能性があります。ただし、これらのフィルターはマルチコートされたものが販売されていないようなので、表面の反射で少し光をロスしてしまうかもしれません。

トランスイルミネーターの電源コードを引き出すため、机に接する塩ビ板に適当な切れ込みを入れた方がいいでしょう。



暗箱内で光が反射して映り込んでしまう場合、内部をつや消し黒で塗装して下さい。机もつや消し黒の天板のものが望ましいです。

カメラが不安定な場合、NOK パッキン UPH 55 80 15 (内径 55mm・外径 80mm・高さ 15mm) を 12-32mm/F3.5-5.6 レンズの鏡筒に巻くと支えやすくなります。

撮影時、レンズの光学手ブレ補正は無効化した方がいいでしょう。充電が面倒でなければ、DC カプラーと AC アダプターを使用せず、バッテリーを用いても問題ありません。



## 付録 B

# 試薬の調製

### B.1 DNA・RNA 固定液の調製

RNAlater の代用品として De Wit *et al.* (2012) でレシピが紹介されているもの。RNAlater と同様に使用することができます。

#### B.1.1 1M クエン酸ナトリウム

##### 必要な機材

- 電子天秤: 1 台
- 100mL 広口ガラス瓶: 1 個
- 100mL メスシリンダー: 1 個
- 300mL ビーカー: 1 個
- 10mL ピペット: 1 本

##### 必要な試薬・消耗品

- クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物 試薬特級 または 分子生物学用: 29.4g
- SPW: 70mL
- SPW: 適量
- SPW: 10mL
- SPW: 適量
- 10mL チップ: 1 本

### 作業手順

1. クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物 29.4g をビーカーで量り取り、SPW 70mL を加えて混ぜつつメスシリンダーに移す
2. SPW で 90mL 弱にメスアップする
3. SPW 10mL でビーカーをすすいでメスシリンダーに加え、さらに SPW で 100mL にメスアップして加熱
4. かろうじて触れる温度でガラス瓶の蓋をしっかりと閉めてよく振り、結晶を完全に溶かす
5. 常温保管

## B.1.2 DNA・RNA 固定液

### 必要な機材

- 電子天秤: 1 台
- 1L 広口ガラス瓶: 1 個
- 100mL メスシリンダー: 1 個
- 500mL ビーカー: 1 個
- 1L ビーカー: 1 個
- 10mL ピペット: 1 本
- pH メーター: 1 台

### 必要な試薬・消耗品

- 1M クエン酸ナトリウム: 12.5mL
- 0.5M EDTA pH8.0: 20mL
- 硫酸アンモニウム 試薬特級 または 分子生物学用: 350g
- SPW: 350mL
- SPW: 50mL
- SPW: 67.5mL
- 1M 硫酸または濃硫酸: 適量
- 10mL チップ: 3 本

### 作業手順

1. 硫酸アンモニウム 350g をビーカーで量り取り、SPW 350mL を加えつつ広口ガラス瓶に移す (100g ずつ複数回に分けて行う。大型の秤量皿があれば使用した方がよい)
2. SPW 50mL でビーカーをすすいで広口ガラス瓶に追加する
3. 1M クエン酸ナトリウム 12.5mL をガラス瓶に加える

4. 0.5M EDTA pH8.0 20mL をガラス瓶に加える
5. SPW 67.5mL をガラス瓶に加えて加熱
6. かりうじて触れる温度でガラス瓶の蓋をしっかりと閉めてよく振り、結晶を完全に溶かす
7. 1L ビーカーに中身を移し、1M 硫酸または濃硫酸を少しずつ加えて pH5.2 にする (濃硫酸で 1mL 以下。1M 硫酸では 18mL 以下)
8. 広口ガラス瓶に戻し、オートクレーブ
9. 常温保管

## B.2 DNA 抽出用試薬の調製

以下の試薬は、Canadian Centre for DNA Barcoding (CCDB) が公開している 96 ウェルグラスファイバークラウドプレートを用いた DNA 抽出方法 (Ivanova *et al.*, 2006) で使用されているものです。本書では、96 ウェルグラスファイバークラウドプレートは容量不足やコンタミネーションリスクのため使用しませんが、スピナカラムを用いるのでこれらの試薬をそのまま使用できます。

### B.2.1 IDTE

EDTA の濃度を通常の 1/10 に減らした TE です。IDT 社がプライマーを溶解させるバッファーとして使用・推奨しています。

#### 必要な機材

- 10 $\mu$ L ピペット: 1 本
- 1000 $\mu$ L ピペット: 1 本
- 10mL ピペット: 1 本

#### 必要な試薬・消耗品

- 1M Tris-HCl pH8.0 500 $\mu$ L
- 0.5M EDTA pH8.0 10 $\mu$ L
- SPW 49mL
- SPW 490 $\mu$ L

#### 作業手順

1. 50mL 遠沈管に SPW 49mL を入れる
2. さらに SPW 490 $\mu$ L を加える

3. 1M Tris-HCl pH8.0 500 $\mu$ L と 0.5M EDTA pH8.0 10 $\mu$ L を加えてオートクレーブ
4. 常温保管

### B.2.2 1M NaCl

#### 必要な機材

- 電子天秤: 1 台
- 500mL 広口ガラス瓶: 1 個
- 500mL メスシリンダー: 1 個
- 500mL ビーカー: 1 個

#### 必要な試薬・消耗品

- NaCl 分子生物学用: 29.22g
- SPW: 500mL
- SPW: 適量

#### 作業手順

1. メスシリンダーで SPW 500mL を量り取る
2. 広口ガラス瓶に SPW 500mL を移して 500mL の計量線を引く
3. 広口ガラス瓶からメスシリンダーに SPW 400mL を移して、残りは捨てる
4. NaCl 29.22g をビーカーで量り取り、広口ガラス瓶からビーカーに SPW を適量加えて再度広口ガラス瓶に戻す
5. SPW で 500mL にメスアップしてオートクレーブ
6. 常温保管

### B.2.3 0.1M Tris-HCl pH6.4

#### 必要な機材

- 電子天秤: 1 台
- 500mL 広口ガラス瓶: 1 個
- 500mL メスシリンダー: 1 個
- 500mL ビーカー: 1 個
- pH メーター: 1 台

## 必要な試薬・消耗品

- トリスアミノメタン: 6.06g
- 1M HCl 分子生物学用: 適量
- SPW: 500mL
- SPW: 適量
- 秤量皿: 1 枚

## 作業手順

1. メスシリンダーで SPW 500mL を量り取る
2. 広口ガラス瓶に SPW 500mL を移して 500mL の計量線を引く
3. 広口ガラス瓶からメスシリンダーに SPW 100mL を移して、残りは捨てる
4. トリスアミノメタン 6.06g をビーカーで SPW 100mL に溶かす
5. 1M HCl を加えて pH 6.4~6.5 にする
6. SPW で 500mL にメスアップしてオートクレーブ
7. 常温保管

## B.2.4 Insect Lysis Buffer

## 必要な機材

- 電子天秤: 1 台
- 500mL 広口ガラス瓶: 1 個
- 500mL メスシリンダー: 1 個
- 500mL ビーカー: 1 個
- 10mL ピペット: 1 本

## 必要な試薬・消耗品

- グアニジンチオシアン酸塩: 41.25g
- 0.5M EDTA pH8.0: 30mL
- 1M Tris-HCl pH8.0: 15mL
- Triton X-100: 2.5mL
- Tween-20: 25mL
- SPW: 500mL
- SPW: 適量
- 10mL チップ: 4 本

### 作業手順

1. メスシリンダーで SPW 500mL を量り取る
2. 広口ガラス瓶に SPW 500mL を移して 500mL の計量線を引く
3. 広口ガラス瓶からメスシリンダーに SPW 200mL を移して、残りは捨てる
4. グアニジンチオシアン酸塩 41.25g をビーカーで量り取り、SPW 200mL を加えつつ広口ガラス瓶に移す
5. 0.5M EDTA pH8.0 30mL、1M Tris-HCl pH8.0 15mL、Triton X-100 2.5mL、Tween-20 25mL を加える
6. SPW で 500mL にメスアップして加熱
7. かるうじて触れる温度でガラス瓶の蓋をしっかりと閉めてよく振り、結晶を完全に溶かす
8. 常温保管

## B.2.5 Column Binding Buffer

### 必要な機材

- 電子天秤: 1 台
- 500mL 広口ガラス瓶: 1 個
- 500mL メスシリンダー: 1 個
- 500mL ビーカー: 1 個
- 10mL ピペット: 1 本

### 必要な試薬・消耗品

- グアニジンチオシアン酸塩: 354.6g
- 0.5M EDTA pH8.0: 20mL
- 0.1M Tris-HCl pH6.4: 50mL
- Triton X-100: 20mL
- SPW: 500mL
- SPW: 適量
- 10mL チップ: 3 本

### 作業手順

1. メスシリンダーで SPW 500mL を量り取る
2. 広口ガラス瓶に SPW 500mL を移して 500mL の計量線を引く
3. 広口ガラス瓶からメスシリンダーに SPW 200mL を移して、残りは捨てる
4. グアニジンチオシアン酸塩 354.6g をビーカーで量り取り、SPW 200mL を加えつつ広口ガラス瓶に移す (100g ずつ複数回に分けて行う。大型の秤量皿があれば使用した方がよい)



5. 0.5M EDTA pH8.0 20mL、0.1M Tris-HCl pH6.4 50mL、Triton X-100 20mL を加える
6. SPW で 500mL にメスアップして加熱
7. かろうじて触れる温度でガラス瓶の蓋をしっかりと閉めてよく振り、結晶を完全に溶かす
8. 常温保管 (使用直前に 56°C に加熱して析出した塩を溶かして使用)

### B.2.6 Wash Buffer 1

#### 必要な機材

- 100μL ピペット: 1 本
- 1000μL ピペット: 1 本
- 10mL ピペット: 1 本

#### 必要な試薬・消耗品

- 50mL 遠沈管: 1 本
- Binding Buffer: 13mL
- 99.5% エタノール 分子生物学用: 35mL
- SPW: 適量
- 1000μL チップ: 1 本
- 10mL チップ: 2 本

#### 作業手順

1. 50mL 遠沈管で材料を混ぜる
2. SPW で 50mL にメスアップする
3. -20°C で保管

遠沈管の目盛り合わせで問題ない。

### B.2.7 Wash Buffer 2

#### 必要な機材

- 100μL ピペット: 1 本
- 1000μL ピペット: 1 本
- 10mL ピペット: 1 本

#### 必要な試薬・消耗品

- 50mL 遠沈管: 1 本
- 99.5% エタノール 分子生物学用: 30mL
- 1M NaCl: 2375 $\mu$ L
- 1M Tris-HCl pH7.5~7.6: 475 $\mu$ L
- 0.5M EDTA pH8.0: 47.5 $\mu$ L
- SPW: 14.6mL
- SPW: 適量 (1.5mL くらい)
- 100 $\mu$ L チップ: 1 本
- 1000 $\mu$ L チップ: 3 本
- 10mL チップ: 1 本

#### 作業手順

1. 50mL 遠沈管で材料を混ぜる
2. SPW で 47.5mL にメスアップする
3. -20°C で保管

遠沈管の目盛り合わせで問題ない。

### B.3 PCR 用 10x ローディングダイの調製

PCR の際に 1/10 量加えることで、PCR 産物をそのままアガロースゲルにアプライできるようにするバッファーです。島津製作所の「電気泳動用色素液 (ローディングダイ) の調製プロトコルと使用方法」に基づいています。Taq でも高正確性酵素でも使えます。酵素にもよるかもしれませんが、増幅成功率や増幅速度などへの影響もほとんどないようです。グリセリンを含みますが、グリセリンがあると磁気ビーズでの PCR 産物精製がうまくいかなくなるため、PCR 産物を磁気ビーズで生成する予定がある場合は使用しないようにご注意願います。PCR 後に PCR 産物溶液と混ぜて電気泳動に使用することもできます。

#### 必要な機材

- 電子天秤: 1 台
- 100mL メスシリンダー: 1 個
- 100mL ビーカー: 1 個
- 10mL 電動ピペット エー・アンド・デイ MPA-10000: 1 本 (吸引吐出速度は最低に設定)

## 必要な試薬・消耗品

- 1M Tris-HCl pH8.0: 1mL
- ブロモフェノールブルー 試薬特級: 100mg
- グリセリン 分子生物学用: 20mL
- SPW: 79mL

## 作業手順

1. メスシリンダーで SPW 50mL を量り取り、ビーカーに入れる
2. ブロモフェノールブルー 100mg、1M Tris-HCl pH8.0 1mL、グリセリン 20mL を加える
3. ビーカーからメスシリンダーに溶液を戻す
4. ビーカーを SPW ですすぎ、メスシリンダーに加える
5. メスシリンダーに SPW を加えて 100mL にメスアップする
6. ビーカーに溶液を戻し、1.5mL チューブに 10mL 電動ピペットで分注する
7. -20°C で保管

## B.4 PCR 産物精製用磁気ビーズ (MagNA) 液の調製

AMPureXP の代用品。Rohland and Reich (2012) の Supplement にレシピが掲載されています。

## 必要な機材

- 電子天秤: 1 台
- 1.5mL または 2mL チューブ用磁気スタンド: 1 台 (強力なネオジム磁石があれば、チューブラックの横に貼る程度でよい)
- 200 $\mu$ L ピペット: 1 本
- 1000 $\mu$ L ピペット: 1 本

## 必要な試薬・消耗品

- 50mL 遠沈管: 1 本
- 1.5mL または 2mL チューブ: 1 本
- GE Healthcare Sera-Mag SpeedBeads Carboxylate-Modified Magnetic Particles (Hydrophobic) (65152105050250): 1mL
- TE: 3mL
- PEG8000 分子生物学用: 9g

- NaCl 分子生物学用: 2.92g
- 1M Tris-HCl pH8.0: 500 $\mu$ L
- 0.5M EDTA pH8.0: 100 $\mu$ L
- SPW: 適量
- 200 $\mu$ L チップ: 1 本
- 1000 $\mu$ L チップ: 6 本
- 秤量皿: 2 枚

#### 作業手順

1. 50mL 遠沈管に SPW を 50mL 注いで、その遠沈管の 50mL の計量線を引く
2. SPW を 10mL 程度捨てる
3. PEG8000 9g と NaCl 2.92g を加える
4. 1M Tris-HCl pH8.0 500 $\mu$ L と 0.5M EDTA pH8.0 100 $\mu$ L を加える
5. SPW で 45mL までメスアップして PEG8000 と NaCl を完全に溶かす
6. 1.5mL または 2mL チューブによく転倒混和した Sera-Mag SpeedBeads を 1mL 取る
7. 磁気スタンドに立てて 5 分待つ
8. 上澄みを吸い取って捨てる (アジ化ナトリウムを含むので取扱に注意)
9. TE 1mL を加えて磁気スタンドから外し、よく転倒混和する
10. 磁気スタンドに立てて 5 分待つ
11. 上澄みを吸い取って捨てる
12. TE 1mL を加えて磁気スタンドから外し、よく転倒混和する
13. 磁気スタンドに立てて 5 分待つ
14. 上澄みを吸い取って捨てて磁気スタンドから外す
15. TE 1mL を加えてビーズを懸濁し、全量を 5 の遠沈管に加える
16. 50mL 遠沈管の中身を SPW で 50mL までメスアップする
17. 遮光して冷蔵保管

## B.5 PCR 産物濃度均一化用磁気ビーズ (BeNUS) 液の調製

Hosomichi *et al.* (2013, 2014) で使用されている濃度均一化用磁気ビーズ液を Sera-Mag SpeedBeads で再現したもの。元文献では AMPureXP から磁気ビーズを回収して作成しているため、こちらの方がずっと低コストです。

#### 必要な機材

- 電子天秤: 1 台
- 1.5mL または 2mL チューブ用磁気スタンド: 1 台 (強力なネオジム磁石があれば、チューブラックの横に貼る程度でよい)
- 200 $\mu$ L ピペット: 1 本

- 1000 $\mu$ L ピペット: 1 本

#### 必要な試薬・消耗品

- 50mL 遠沈管: 1 本
- 1.5mL または 2mL チューブ: 1 本
- GE Healthcare Sera-Mag SpeedBeads Carboxylate-Modified Magnetic Particles (Hydrophobic) (65152105050250): 200 $\mu$ L
- TE: 2.5mL
- PEG8000 分子生物学用: 10g
- NaCl 分子生物学用: 7.3g
- SPW: 適量
- 200 $\mu$ L チップ: 1 本
- 1000 $\mu$ L チップ: 3 本
- 秤量皿: 2 枚

#### 作業手順

1. 50mL 遠沈管に SPW 50mL を注いで、その遠沈管の 50mL の計量線を引く
2. SPW を 10mL 程度捨てる
3. PEG8000 10g と NaCl 7.3g を加える
4. SPW で 45mL までメスアップして PEG8000 と NaCl を完全に溶かす
5. SPW で 50mL までメスアップする
6. 1.5mL または 2mL チューブによく転倒混和した Sera-Mag SpeedBeads を 200 $\mu$ L 取る
7. TE 500 $\mu$ L を加えてピペッティングして混ぜ、磁気スタンドに立てて 5 分待つ
8. 上澄みを吸い取って捨てる (アジ化ナトリウムを含むので取扱に注意)
9. TE 1mL を加えて磁気スタンドから外し、よく転倒混和する
10. 磁気スタンドに立てて 5 分待つ
11. 上澄みを吸い取って捨てる
12. TE 1mL を加えて磁気スタンドから外し、よく転倒混和する
13. 磁気スタンドに立てて 5 分待つ
14. 上澄みを吸い取って捨てて磁気スタンドから外す
15. 5 の溶液 1mL をチューブに加えてビーズを懸濁し、全量を 5 の遠沈管に戻す
16. 透明な部分の 5 の溶液 1mL をチューブに加えて残っているビーズを懸濁し、全量を 5 の遠沈管に戻して転倒混和する
17. 遮光して冷蔵保管