



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

2019 年 7 月 3 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とネガティブコントロール	4
1.3 水からの濾過採集方法	4
1.3.1 濾過フィルターの選定	4
1.3.2 濾過方法の選定	6
1.3.3 サンプル固定方法の選定	6
1.3.4 濾過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	7
1.3.5 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	8
必要な機材	8
必要な消耗品	8
作業手順	9
1.3.6 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	10
必要な機材	10
必要な消耗品	10
作業手順	11
第 2 章 DNA 抽出・ライブラリ調製・シーケンシング	13
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	13
2.2 テクニカルレプリケートとネガティブコントロール	14
2.3 DNA 抽出	14
2.3.1 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	14
必要な機材	14
必要な試薬・消耗品	14
作業手順	15
2.3.2 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	16
必要な機材	16
必要な試薬・消耗品	16
作業手順	16

2.3.3	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	18
	必要な機材	18
	必要な試薬・消耗品	18
	作業手順	19
2.3.4	Sterivex 水抜きサンプルからの DNA 抽出プロトコル	20
	必要な機材	20
	必要な試薬・消耗品	20
	作業手順	21
2.3.5	Sterivex 固定液入サンプルからの DNA 抽出プロトコル	22
	必要な機材	22
	必要な試薬・消耗品	22
	作業手順	23
2.3.6	磁気ビーズを用いた DNA の精製プロトコル	24
	必要な機材	24
	必要な試薬・消耗品	25
	作業手順	25
2.4	ライブラリ調製	25
2.4.1	プライマーの設計と発注の方法	25
2.4.2	鋳型 DNA 希釈率の決定	26
2.4.3	ユニバーサルプライマーを用いた PCR のプロトコル (泳動用)	26
	必要な機材	26
	必要な試薬・消耗品	26
	作業手順	26
2.4.4	アガロースゲル電気泳動のプロトコル	27
	必要な機材	27
	必要な試薬・消耗品	27
	作業手順	27
2.4.5	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)	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 PCR 産物の精製プロトコル	27
	必要な機材	27
	必要な試薬・消耗品	28
	作業手順	28
2.4.7	Exonuclease I を用いた PCR 産物の精製プロトコル	28
	必要な機材	28
	必要な試薬・消耗品	28
	作業手順	28
2.4.8	アダプターを付加する PCR のプロトコル	28
	必要な機材	28
	必要な試薬・消耗品	28

	作業手順	29
2.4.9	インデックスと P5・P7 アダプターを付加する PCR のプロトコル	29
	必要な機材	29
	必要な試薬・消耗品	29
	作業手順	29
2.4.10	インデックスと P5・P7 アダプターが付加できているかどうか確認するための PCR のプロトコル	29
	必要な機材	29
	必要な試薬・消耗品	29
	作業手順	29
2.4.11	磁気ビーズを用いた PCR 産物の濃度均一化	30
	必要な機材	30
	必要な試薬・消耗品	30
	作業手順	30
2.4.12	E-Gel SizeSelect によるサイズ選択	30
	必要な機材	30
	必要な試薬・消耗品	30
	作業手順	30
2.5	ライブラリのクオリティチェック	30
2.5.1	Qubit による濃度測定と希釈	30
	必要な機材	30
	必要な試薬・消耗品	31
	作業手順	31
2.5.2	Bioanalyzer による電気泳動	31
	必要な機材	31
	必要な試薬・消耗品	31
	作業手順	31
2.6	MiSeq によるシーケンス	31
	必要な機材	31
	必要な試薬・消耗品	31
	作業手順	31
引用文献		33
付録 A	DNA 採集関連機材の自作	35
A.1	漂白剤抜き器の作成	35
	必要な機材	35
	必要な部材	35
	作業手順	35
A.2	車載用吸引ポンプユニットの作成	36
	必要な機材	36
	必要な部材	36

	作業手順	36
A.3	吸引濾過装置の作成	37
	必要な機材	37
	必要な部材	37
	作業手順	37
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の作成	38
	必要な機材	38
	必要な部材	38
	作業手順	38
付録 B	試薬の調製	39
B.1	DNA・RNA 固定液の調製	39
B.1.1	1M クエン酸ナトリウム	39
	必要な機材	39
	必要な試薬・消耗品	39
	作業手順	40
B.1.2	DNA・RNA 固定液	40
	必要な機材	40
	必要な試薬・消耗品	40
	作業手順	40
B.2	DNA 抽出用試薬の調製	41
B.2.1	IDTE	41
	必要な機材	41
	必要な試薬・消耗品	41
	作業手順	41
B.2.2	1M NaCl	42
	必要な機材	42
	必要な試薬・消耗品	42
	作業手順	42
B.2.3	0.1M Tris-HCl pH6.4	42
	必要な機材	42
	必要な試薬・消耗品	43
	作業手順	43
B.2.4	Insect Lysis Buffer	43
	必要な機材	43
	必要な試薬・消耗品	43
	作業手順	44
B.2.5	Column Binding Buffer	44
	必要な機材	44
	必要な試薬・消耗品	44
	作業手順	44
B.2.6	Wash Buffer 1	45

	必要な機材	45
	必要な試薬・消耗品	45
	作業手順	45
B.2.7	Wash Buffer 2	45
	必要な機材	45
	必要な試薬・消耗品	46
	作業手順	46
B.3	PCR 用 10x ローディングバッファの調製	46
	必要な機材	46
	必要な試薬・消耗品	47
	作業手順	47
B.4	PCR 産物精製用磁気ビーズ (MagNA) 液の調製	47
	必要な機材	47
	必要な試薬・消耗品	47
	作業手順	48
B.5	PCR 産物濃度均一化用磁気ビーズ (BeNUS) 液の調製	48
	必要な機材	48
	必要な試薬・消耗品	49
	作業手順	49

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ください。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生態学研究センターの東樹宏和博士、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とネガティブコントロール

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ください。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 水からの濾過採集方法

1.3.1 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 μ m Millipore Sterivex-HV SVHV010RS
 - * 0.22 μ m Millipore Sterivex-GV SVGV010RS
 - PES 製濾過膜
 - * 0.22 μ 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 μ m Whatman GF/C 1822-047
 - * 0.7 μ m Whatman GF/F 1825-047

- * 0.7 μ m Millipore AP40 AP4004705
- ポリカーボネート製濾過膜
 - * 12.0 μ m Whatman Nuclepore 111116
 - * 10.0 μ m Whatman Nuclepore 111115
 - * 10.0 μ m Millipore Isopore TCTP04700
 - * 8.0 μ m Millipore Isopore TETP04700
 - * 5.0 μ m Millipore Isopore TMTP04700
 - * 3.0 μ m Whatman Nuclepore 111112
 - * 3.0 μ m Millipore Isopore TSTP04700
 - * 2.0 μ m Whatman Nuclepore 111111
 - * 2.0 μ m Millipore Isopore TTTP04700
 - * 1.2 μ m Millipore Isopore RTTP04700
 - * 1.0 μ m Whatman Nuclepore 111110
 - * 0.8 μ m Millipore Isopore ATTP04700
 - * 0.6 μ m Millipore Isopore DTTP04700
 - * 0.4 μ m Millipore Isopore HTTP04700
 - * 0.22 μ m Millipore Isopore GTTP04700
- セルロース混合エステル製濾過膜
 - * 8.0 μ m Millipore MF-Millipore SCWP04700
 - * 5.0 μ m Millipore MF-Millipore SMWP04700
 - * 3.0 μ m Millipore MF-Millipore SSWP04700
 - * 1.2 μ m Millipore MF-Millipore RAWP04700
 - * 0.8 μ m Millipore MF-Millipore AAWP04700
 - * 0.65 μ m Millipore MF-Millipore DAWP04700
 - * 0.45 μ m Millipore MF-Millipore HAWP04700
 - * 0.3 μ m Millipore MF-Millipore PHWP04700
 - * 0.22 μ m Millipore MF-Millipore GSWP04700
- PVDF 製濾過膜
 - * 0.45 μ m Millipore Durapore HVLP04700
 - * 0.22 μ m Millipore Durapore GVWP04700
- PES 製濾過膜
 - * 0.45 μ m Millipore Millipore Express PLUS HPWP04700
 - * 0.22 μ 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。

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などの剪刀で刻みにくいフィルターは使用できません。

1.3.2 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。

1.3.3 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。

1.3.4 濾過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. 漂白対象物が浸かるように水道水を注ぐ
3. 水道水の 5–10% 量のハイター E を入れてかき混ぜる
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を移す
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 °C で乾燥する (60 °C にする前に一度 200 °C 以上で庫内を滅菌してから 60 °C 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。

1.3.5 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: 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 μ m PVDF SVHV010RS
 - Millipore Sterivex-GV 0.22 μ m PVDF SVGV010RS
 - Millipore Sterivex-GP 0.22 μ m PES SVGP01050
- フィルターユニットに適合するアダプタ (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. アダプタ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 (アダプタの接着面に力がかからないように注意すること)
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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)
15. 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
16. 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
17. 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 (アダプタは残す)
18. 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)
19. 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
20. 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
21. 濾過フィルターユニットを吸引濾過装置から外す
22. ポリ手袋を交換する
23. 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)

24. ポリ手袋を外して捨てる
25. 吸引濾過装置の両側下部バルブを開放する (吸引濾過装置内の残留水がタンクに吸い込まれる)
26. 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

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。

1.3.6 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

- タジマ コーキングガン 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)
- 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・氷点下バック 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
- サンダイヤ デッキ型ピンセット 125mm (アズワン品番 6-531-12): 2 本
- 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
- ライター: 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 または JMS 注射針なしシリンジ ロックタイプ 50mL JS-S50L: 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. ピンセット 2 本を火炎滅菌し、そのピンセットを用いてワッシャーを火炎滅菌し、コーキングガン先端にワッシャーの面が取れている方が Sterivex に接するようセットする
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. 使い捨てビ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
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押してカウントアップ
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. 必要な水量の濾過が終わったら、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. 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
19. ポリ手袋を外して捨てる

ワッシャーは、サンプル数分用意して予め乾熱滅菌し、アルミホイルで個包装しておくことで火炎滅菌を省略できます。JMS のシリンジには 100mL タイプ (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 40mm・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。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

マイクロ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。

金属製またはフッ素樹脂機材 オープンを用いて乾熱滅菌する。250℃で 30 分。

ガラスまたはフェノール樹脂機材 オープンを用いて乾熱滅菌する。200℃で 4 時間。

PBT 樹脂機材 オープンを用いて乾熱滅菌する。180℃で 8 時間。

その他のプラスチック機材 タライで塩素漂白する。20 倍希釈漂白液で 10 分。

乾熱滅菌、塩素漂白できない機材 DNA-OFF 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して冷まし、クリーンベンチ内で紫外線を照射する。

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、PEG8000 を含む溶液をオートクレーブしてはいけません)。作業後の実験台やマイクロピペットは DNA-OFF を染み込ませたペーパータオルで拭き取ります。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 ですすいで乾かします。インキュベータは 250℃まで上げられるものであれば、250℃で 30 分ほど内部を乾熱滅菌します。

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、樹脂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нкаラム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 Sterivex の遠心には、トミー精工 LCX-200 に TS-33C スイングロータと B433 パケット、3315-TC04P ラックの組み合わせや、久保田商事 Model 4000 に ST-2504MS スイングロータと 055-1160 ラックの組み合わせ、himac CT6E に T5SS スイングロータと S409814A ラックの組み合わせが便利です。これらの製品はラックが樹脂製のため、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。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手数は減らせますが、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ニングカラムに入れる作業、PCR前の準備をしてから、鋳型としてのPCR産物を加える作業だけ、クリーンベンチ内で行っています(作業中、ファンは使用しない)。

2.2 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。

2.3 DNA抽出

2.3.1 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を参照してください。

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
- HOZAN ピンセット P-888: 1本
- ライター: 1本
- 100μL チップ用マイクロピペット: 1本
- 200μL チップ用マイクロピペット: 1本
- 1000μL チップ対応マイクロピペット: 1本
- エー・アンド・デイ 10mL チップ対応電動ピペット MPA-10000: 1本

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: 200 μ L / 1 サンプル (析出に注意)
- Wash Buffer 1: 500 μ L / 1 サンプル
- Wash Buffer 2: 500 μ L / 1 サンプル
- 99.5% エタノール: 200 μ L / 1 サンプル
- IDTE: 120 μ L / 1 サンプル
- 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. 2mL チューブで、Insect Lysis Buffer 200 μ L と 20mg/mL Proteinase-K 10 μ L をサンプル数倍混ぜておく (最大 8 サンプル分/チューブ)
3. サンプルを用意する
4. 1.5mL チューブに仮ラベルを振って、2 を 200 μ L ずつ分注する
5. ピンセット先端を火炎滅菌する
6. 1 個だけ 1.5mL チューブの蓋を開ける
7. サンプルを 1.5mL チューブに入れる
8. 5-7 をサンプル数分繰り返す
9. 56 °C で 1 時間以上インキュベートする
10. 新しい 1.5mL チューブに仮ラベルを振って、Binding Buffer 200 μ L と 99.5% エタノール 200 μ L を入れておく
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 DNA 低吸着チューブには正式なラベルを振っておく
13. 2mL チューブで、IDTE 120 μ L をサンプル数倍 + 50 μ 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)
14. インキュベートが 1 時間経ったら、9 のチューブを 20 °C 6000 \times g で 1 分遠心して上清を 10 のチューブに移してピペッティングして、混合液 600 μ L を新しいカラムに加える
15. カラムを 20 °C 6000 \times g で 1 分遠心して濾液を捨てる
16. カラムに Wash Buffer 1 を 10mL 電動ピペットで 500 μ L 加えて 20 °C 6000 \times g で 1 分遠心し、濾液を捨てる
17. カラムに Wash Buffer 2 を 10mL 電動ピペットで 500 μ L 加えて 20 °C 20000 \times g で 3 分遠心する
18. エタノールを除去するため、20 °C 20000 \times g で更に 1 分遠心する
19. 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)
20. 13 で加温しておいた IDTE 120 μ L をカラムの中心に加える (1 サンプルごとにチップ交換)
21. 20 °C 6000 \times g で 1 分遠心し、濾液を回収する
22. -20 °C で保管

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)。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)。

2.3.2 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 を参照してください。

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 逆作用ピンセット P-652: 1 本
- ライター: 1 本
- 100μL チップ用マイクロピペット: 1 本
- 200μL チップ用マイクロピペット: 1 本
- 1000μL チップ対応マイクロピペット: 1 本
- エー・アンド・デイ 10mL チップ対応電動ピペット MPA-10000: 1 本

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: 400μL / 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: 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. 2mL チューブで、Insect Lysis Buffer 200 μ L と 20mg/mL Proteinase-K 10 μ L をサンプル数倍混ぜておく (最大 8 サンプル分/チューブ)
3. 2mL チューブで、IDTE 200 μ L をサンプル数倍 + 50 μ 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)
4. ディスクフィルターを解凍する
5. 空カラムに仮ラベルを振っておく
6. 2 本のピンセット先端を火炎滅菌する
7. 1 個だけ空カラムの蓋を開ける
8. 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
9. 先端ストレートのピンセットを回転させてフィルターを筒状に丸める (先曲がりの方を回しても構わない)
10. 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、先曲がりピンセットを外す
11. 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
12. 先曲がりピンセットでフィルターを押さえ、先端ストレートのピンセットを抜き取る
13. 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
14. 6-13 をサンプル数分繰り返す (ただし、4 サンプル溜まったら 15-16 を行う)
15. 空カラムのフタを閉じ、20 °C 20000 \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
16. 空カラムに 2 をフィルターの上から 200 μ L 加える (1 サンプルごとにチップ交換)
17. 56 °C で 1 時間以上インキュベートする
18. 新しい 1.5mL チューブに仮ラベルを振って、Binding Buffer 400 μ L と 99.5% エタノール 400 μ L を入れておく
19. 新しいカラムにも仮ラベルを振っておく
20. 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
21. 2mL チューブで、IDTE 120 μ L をサンプル数倍 + 50 μ 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)
22. インキュベートが 1 時間経ったら、17 の空カラムを 20 °C 6000 \times g で 1 分遠心して濾液はそのままにする
23. 空カラムに 3 の加温しておいた IDTE 200 μ L をフィルターの上から加える (1 サンプルごとにチップ交換)
24. 空カラムを 20 °C 20000 \times g で 1 分遠心し、濾液を 18 のチューブに移してピペティングして、混合液 600 μ L を新しいカラムに加える
25. カラムを 20 °C 6000 \times g で 1 分遠心して濾液を捨てる
26. 24 のチューブから残りの混合液をカラムに加える
27. カラムを 20 °C 6000 \times 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 500 μ L 加えて 20 °C 6000 \times g で 1 分遠心し、濾液を捨てる
29. カラムに Wash Buffer 2 を 10mL 電動ピペットで 500 μ L 加えて 20 °C 20000 \times g で 3 分遠心する
30. エタノールを除去するため、20 °C 20000 \times g で更に 1 分遠心する
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. 18 で加温しておいた IDTE 120 μ L をカラムの中心に加える (1 サンプルごとにチップ交換)
33. 20 °C 6000 \times g で 1 分遠心し、濾液を回収する
34. -20 °C で保管

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

いかかもしれません (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をフィルターを通して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℃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ください。

2.3.3 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を参照してください。

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 逆作用ピンセット P-652: 1本
- ライター: 1本
- 100μL チップ用マイクロピペット: 1本
- 200μL チップ用マイクロピペット: 1本
- 1000μL チップ対応マイクロピペット: 1本
- エー・アンド・デイ 10mL チップ対応電動ピペット MPA-10000: 1本

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: 120 μ 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. 2mL チューブで、Insect Lysis Buffer 200 μ L と 20mg/mL Proteinase-K 10 μ L をサンプル数倍混ぜておく (最大 8 サンプル分/チューブ)
3. 2mL チューブで、Binding Buffer 200 μ L をサンプル数倍 + 50 μ 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)
4. ディスクフィルターを解凍する
5. 空カラムに仮ラベルを振っておく
6. 2 本のピンセット先端を火炎滅菌する
7. 1 個だけ空カラムの蓋を開ける
8. 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
9. 先端ストレートのピンセットを回転させてフィルターを筒状に丸める (先曲がりの方を回しても構わない)
10. 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、先曲がりピンセットを外す
11. 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
12. 先曲がりピンセットでフィルターを押さえ、先端ストレートのピンセットを抜き取る
13. 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
14. 6-13 をサンプル数分繰り返す (ただし、4 サンプル溜まったら 15-16 を行う)
15. 空カラムのフタを閉じ、20 °C 20000 \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
16. 空カラムに 2 をフィルターの上から 200 μ L 加える (1 サンプルごとにチップ交換)
17. 56 °C で 1 時間以上インキュベートする
18. 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 μ L を入れておく
19. 新しいカラムにも仮ラベルを振っておく
20. 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
21. 2mL チューブで、IDTE 120 μ L をサンプル数倍 + 50 μ 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)
22. インキュベートが 1 時間経ったら、17 の空カラムを 20 °C 6000 \times g で 1 分遠心して濾液はそのままにする
23. 空カラムに 3 の加温しておいた Binding Buffer 200 μ L をフィルターの上から加える (1 サンプルごとにチップ交換)
24. 空カラムを 20 °C 20000 \times g で 1 分遠心し、濾液を 18 のチューブに移してピペティングして、混合液 600 μ L を新しいカラムに加える
25. カラムを 20 °C 6000 \times g で 1 分遠心して濾液を捨てる
26. カラムに Wash Buffer 1 を 10mL 電動ピペットで 500 μ L 加えて 20 °C 6000 \times g で 1 分遠心し、濾液を捨てる
27. カラムに Wash Buffer 2 を 500 μ L 加えて 20 °C 20000 \times g で 3 分遠心する
28. エタノールを除去するため、20 °C 20000 \times g で更に 1 分遠心する
29. 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)
30. 18 で加温しておいた IDTE 120 μ L をカラムの中心に加える (1 サンプルごとにチップ交換)

31. 20℃ 6000 × g で1分遠心し、濾液を回収する
32. -20℃で保管

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、TE で追加の溶出を行う必要がありません (セルロース混合エステルは不明です)。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。

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。

2.3.4 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 を参照してください。

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 チップ用マイクロピペット: 1 本
- 200μL チップ用マイクロピペット: 1 本
- 1000μL チップ対応マイクロピペット: 1 本
- エー・アンド・デイ 10mL チップ対応電動ピペット MPA-10000: 1 本

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: 10μL / 1 サンプル
- Insect Lysis Buffer: 200μL / 1 サンプル (析出に注意)
- Binding Buffer: 400μL / 1 サンプル (析出に注意)

- Wash Buffer 1: 500 μ L / 1 サンプル
- Wash Buffer 2: 500 μ L / 1 サンプル
- 99.5% エタノール: 400 μ L / 1 サンプル
- IDTE: 200 μ L / 1 サンプル
- IDTE: 120 μ 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 ϕ 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 1527EP-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 $^{\circ}$ C に設定
2. 2mL チューブで、Binding Buffer 200 μ L、Insect Lysis Buffer 205 μ L と 20mg/mL Proteinase-K 20 μ L をサンプル数倍混ぜておく (最大 4 サンプル分/チューブ)
3. 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
4. 15mL 遠沈管対応のローターに Sterivex とチューブを差し込み、20 $^{\circ}$ C 4000 \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)
5. 3mL 丸底テストチューブを Sterivex から外して捨てる
6. Sterivex の入口側から 2 の混合液 420 μ L を 1000 μ 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)
7. 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 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートする
8. 新しい 3mL 丸底テストチューブに仮ラベルを振っておく
9. 新しいカラムにも仮ラベルを振っておく
10. 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 μ L を入れておく
11. 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
12. 2mL チューブで、IDTE 120 μ L をサンプル数倍 + 50 μ L 分注し、56 $^{\circ}$ C に加温しておく (最大 16 サンプル分/チューブ)
13. インキュベートが 30 分経ったら、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
14. Sterivex + 3mL 丸底テストチューブを 20 $^{\circ}$ C 4000 \times g で 2 分間遠心して濾液を回収する
15. 濾液を 10 のチューブに移してピペティングして、混合液 600 μ L (少し多くても 700 μ L 以下なら全部取る) を新しいカラムに加える
16. カラムを 20 $^{\circ}$ C 6000 \times g で 1 分遠心して濾液を捨てる
17. カラムに Wash Buffer 1 を 10mL 電動ピペットで 500 μ L 加えて 20 $^{\circ}$ C 6000 \times g で 1 分遠心し、濾液を捨てる
18. カラムに Wash Buffer 2 を 10mL 電動ピペットで 500 μ L 加えて 20 $^{\circ}$ C 20000 \times g で 3 分遠心する
19. エタノールを除去するため、20 $^{\circ}$ C 20000 \times g で更に 1 分遠心する
20. 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)
21. 12 で加温しておいた IDTE 120 μ L をカラムの中心に加える (1 サンプルごとにチップ交換)

22. 20℃ 6000 × g で1分遠心し、濾液を回収する
23. -20℃で保管

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ください。

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℃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、Insect Lysis Buffer の代わりに PBS などを用いた方がよいでしょう。

2.3.5 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 を参照してください。

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 チップ用マイクロピペット: 1本
- 200μL チップ用マイクロピペット: 1本
- 1000μL チップ対応マイクロピペット: 1本
- エー・アンド・デイ 10mL チップ対応電動ピペット MPA-10000: 1本

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: 10 μ L / 1 サンプル
- Insect Lysis Buffer: 200 μ L / 1 サンプル (析出に注意)
- Binding Buffer: 400 μ L / 1 サンプル (析出に注意)
- Wash Buffer 1: 500 μ L / 1 サンプル
- Wash Buffer 2: 500 μ L / 1 サンプル
- 99.5% エタノール: 400 μ L / 1 サンプル
- IDTE: 200 μ L / 1 サンプル
- IDTE: 120 μ L / 1 サンプル
- SPW: 2mL / 1 サンプル
- 3M トランスポア サージカルテープ 25mm 幅 1527EP-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. 2mL チューブで、Binding Buffer 200 μ L、20mg/mL Proteinase-K 20 μ L をサンプル数倍混ぜておく (最大 8 サンプル分/チューブ)
3. 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
4. 15mL 遠沈管対応のローターに Sterivex とチューブを差し込み、20 °C 4000 \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)
5. 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
6. Sterivex の入口側キャップを外し、SPW 1mL を 1000 μ 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)
7. Sterivex の入口側キャップを取り付け、20 °C 4000 \times g で 2 分間遠心して排液する
8. 6-7 を再度繰り返す
9. この時点で十分に薄まった固定液が Sterivex 内に 200 μ L 近く入っている
10. 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
11. Sterivex の入口側キャップを外し、2 の混合液 220 μ L を 1000 μ 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)
12. 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 30 分インキュベートする
13. 新しい 3mL 丸底テストチューブに仮ラベルを振っておく
14. 新しいカラムにも仮ラベルを振っておく
15. 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 μ L を入れておく
16. 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
17. 2mL チューブで、IDTE 120 μ L をサンプル数倍 + 50 μ 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)

18. インキュベートが30分経ったら、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
19. Sterivex + 3mL丸底テストチューブを20℃ 4000 × gで2分間遠心して濾液を回収する
20. 濾液を15のチューブに移してピペッティングして、混合液600μL(少し多くても700μL以下なら全部取る)を新しいカラムに加える
21. カラムを20℃ 6000 × gで1分遠心して濾液を捨てる
22. カラムにWash Buffer 1を10mL電動ピペットで500μL加えて20℃ 6000 × gで1分遠心し、濾液を捨てる
23. カラムにWash Buffer 2を10mL電動ピペットで500μL加えて20℃ 20000 × gで3分遠心する
24. エタノールを除去するため、20℃ 20000 × gで更に1分遠心する
25. 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)
26. 17で加温しておいたIDTE 120μLをカラムの中心に加える(1サンプルごとにチップ交換)
27. 20℃ 6000 × gで1分遠心し、濾液を回収する
28. -20℃で保管

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、SPWの代わりにPBSなどを用いた方がよいでしょう。

2.3.6 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手間が非常に大きいので、筆者はあまりこの方法は使用していません。

必要な機材

- 1.5mL または 2mL チューブ用磁気スタンド (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): 1台
- エー・アンド・デイ 10mL チップ対応電動ピペット MPA-10000: 1本

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)
- サンプル DNA 溶液

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で 10mL 電動ピペットで 70% エタノール 900 μ 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で 10mL 電動ピペットで 70% エタノール 900 μ L を加える
11. エタノールを吸い取って捨てる
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

2.4 ライブラリ調製

2.4.1 プライマーの設計と発注の方法

あとでかく。

発注は IDT を使うべし (質が違う)。

2.4.2 鋳型 DNA 希釈率の決定

鋳型 DNA 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 がうまくかからず、増幅することが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。

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、これらを等倍、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、これは両者の中間的な性質です。

2.4.3 ユニバーサルプライマーを用いた PCR のプロトコル (泳動用)

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

- 10x ローディングバッファ (作成方法は付録 B.3 を参照)

作業手順

- 1.

2.4.4 アガロースゲル電気泳動のプロトコル

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.5 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)

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.6 磁気ビーズを用いた PCR 産物の精製プロトコル

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.7 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 社製シーケンサ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。

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.8 アダプターを付加する PCR のプロトコル

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.9 インデックスと P5・P7 アダプターを付加する PCR のプロトコル

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.10 インデックスと P5・P7 アダプターが付加できているかどうか確認するための PCR のプロトコル

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.11 磁気ビーズを用いた PCR 産物の濃度均一化

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.12 E-Gel SizeSelect によるサイズ選択

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.5 ライブラリのクオリティチェック

2.5.1 Qubit による濃度測定と希釈

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.5.2 Bioanalyzer による電気泳動

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.6 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

- 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**, No. 6, 1058–1067.
- 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**, No. 1, 355, May.
- 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**, No. 1, 645, August.
- 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**, No. 4, 998–1002.
- 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)*, No. 117, e54741, November.
- Rohland, N. and Reich, D., 2012, "Cost-Effective, High-Throughput DNA Sequencing Libraries for Multiplexed Target Capture", *Genome Research*, **22**, No. 5, 939–946, January.
- 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**, No. 1, 13–19.
- 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**, No. 0.
- 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**, No. 3, 793–802, November.
- 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**, No. 2, 233–241, April.

付録 A

DNA 採集関連機材の自作

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 個
- ハサミ: 1 個
- カッターナイフ: 1 個
- 電動ドリル: 1 台
- ドリルビット 7mm: 1 個

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 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ください。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。

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 個
- ドリルビット 5mm: 1 個

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の作成

必要な機材

- あとでかく

必要な部材

- あとでかく

作業手順

1. あとでかく

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 チップ対応ピペット: 1 本

必要な試薬・消耗品

- クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物: 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 にメスアップしてオートクレーブ
4. 触れる温度まで下がったら、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 チップ対応ピペット: 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: 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 をガラス瓶に加える
6. 湯煎かオートクレーブで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)
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 ウェルガラスファイバープレートを用いた 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 ウェルガラスファイバー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нка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 μ L チップ対応マイクロピペット: 1 本
- 1000 μ L チップ対応マイクロピペット: 1 本
- 10mL チップ対応ピペット: 1 本

必要な試薬・消耗品

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

作業手順

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

3. 1M Tris-HCl pH8.0 500 μ L と 0.5M EDTA pH8.0 10 μ 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 チップ対応ピペット: 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 にメスアップしてオートクレーブ (グアニジンチオシアン酸塩はこのとき溶ける)
7. 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 チップ対応ピペット: 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 にメスアップしてオートクレーブ (グアニジンチオシアン酸塩はこのとき溶ける)
7. 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

- 100 μ L チップ用マイクロピペット: 1 本
- 1000 μ L チップ対応マイクロピペット: 1 本
- 10mL チップ対応ピペット: 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
- 1000 μ L 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

- 100 μ L チップ用マイクロピペット: 1 本
- 1000 μ L チップ対応マイクロピペット: 1 本
- 10mL チップ対応ピペット: 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 μ L
- 1M Tris-HCl pH7.5–7.6: 475 μ L
- 0.5M EDTA pH8.0: 47.5 μ L
- SPW: 14.6mL
- SPW: 適量 (1.5mL くらい)
- 100 μ L チップ: 1 本
- 1000 μ 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 ローディングバッファの調製

PCR の際に 1/10 量加えることで、PCR 後に 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。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。グリセリンを含むが、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こと。

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
- エー・アンド・デイ 10mL チップ対応電動ピペット MPA-10000: 1 本

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 (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): 1 台
- 200 μ L チップ用マイクロピペット: 1 本
- 1000 μ L チップ対応マイクロピペット: 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 μ L
- 0.5M EDTA pH8.0: 100 μ L
- SPW: 適量
- 200 μ L チップ: 1 本
- 1000 μ 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 μ L と 0.5M EDTA pH8.0 100 μ 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 (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): 1 台
- 200 μ L チップ用マイクロピペット: 1 本

- 1000 μ L チップ対応マイクロピペット: 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 μ 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 μ L チップ: 1 本
- 1000 μ 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 μ L 取る
7. TE 500 μ 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