



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 5 月 30 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 サンプルングデザイン	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 濾過フィルターと濾過方法と固定方法の選定	4
1.3.2 濾過関連機材の塩素漂白の方法	4
必要な機材	4
必要な消耗品	4
作業手順	4
1.3.3 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	5
必要な機材	5
必要な消耗品	5
作業手順	5
1.3.4 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	5
必要な機材	5
必要な消耗品	5
作業手順	5
第 2 章 DNA 抽出・ライブラリ調製・シーケンシング	7
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防止	7
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	7
2.3 DNA 抽出	7
2.3.1 47mm グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出プロトコル	7
必要な機材	7
必要な試薬・消耗品	7
作業手順	7
2.3.2 47mm 非グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出プロトコル	7
必要な機材	7
必要な試薬・消耗品	8
作業手順	8
2.3.3 ステリベクスからの DNA 抽出プロトコル	8
必要な機材	8

	必要な試薬・消耗品	8
	作業手順	8
2.3.4	磁気ビーズを用いた DNA の精製プロトコル	8
	必要な機材	8
	必要な試薬・消耗品	8
	作業手順	8
2.4	ライブラリ調製	9
	必要な機材	9
	必要な試薬・消耗品	9
	作業手順	9
2.4.1	プライマーの設計と発注の方法	9
	必要な機材	9
	必要な試薬・消耗品	9
	作業手順	9
2.4.2	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)	9
	必要な機材	9
	必要な試薬・消耗品	10
	作業手順	10
2.4.3	アガロースゲル電気泳動のプロトコル	10
	必要な機材	10
	必要な試薬・消耗品	10
	作業手順	10
2.4.4	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)	10
	必要な機材	10
	必要な試薬・消耗品	10
	作業手順	10
2.4.5	磁気ビーズを用いた PCR 産物の精製プロトコル	11
	必要な機材	11
	必要な試薬・消耗品	11
	作業手順	11
2.4.6	Exonuclease I を用いた PCR 産物の精製プロトコル	11
	必要な機材	11
	必要な試薬・消耗品	11
	作業手順	11
2.4.7	アダプターを付加する PCR のプロトコル	11
	必要な機材	11
	必要な試薬・消耗品	12
	作業手順	12
2.4.8	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	12
	必要な機材	12
	必要な試薬・消耗品	12
	作業手順	12

2.4.9	磁気ビーズを用いた PCR 産物の濃度均一化	12
	必要な機材	12
	必要な試薬・消耗品	12
	作業手順	12
2.4.10	E-Gel SizeSelect によるサイズ選択	13
	必要な機材	13
	必要な試薬・消耗品	13
	作業手順	13
2.5	ライブラリのクオリティチェック	13
2.5.1	Qubit による濃度測定と希釈	13
	必要な機材	13
	必要な試薬・消耗品	13
	作業手順	13
2.5.2	Bioanalyzer による電気泳動	13
	必要な機材	13
	必要な試薬・消耗品	14
	作業手順	14
2.6	MiSeq によるシーケンス	14
	必要な機材	14
	必要な試薬・消耗品	14
	作業手順	14
引用文献		15
付録 A	DNA 採集関連機材の自作	17
A.1	塩素漂白・塩素抜き器の作成	17
	必要な機材	17
	必要な部材	17
	作業手順	17
A.2	車載用吸引ポンプユニットの作成	17
	必要な機材	17
	必要な部材	17
	作業手順	18
A.3	吸引濾過装置の作成	18
	必要な機材	18
	必要な部材	18
	作業手順	18
付録 B	試薬の調製	19
B.1	DNA・RNA 固定液の調製	19
	必要な機材	19
	必要な試薬・消耗品	19
	作業手順	19

B.2	DNA 抽出用試薬の調製	19
B.2.1	Insect Lysis Buffer	19
	必要な機材	19
	必要な試薬・消耗品	19
	作業手順	20
B.2.2	Column Binding Buffer	20
	必要な機材	20
	必要な試薬・消耗品	20
	作業手順	20
B.2.3	Wash Buffer	20
	必要な機材	20
	必要な試薬・消耗品	20
	作業手順	20
B.3	PCR 産物精製用磁気ビーズ液の調製	21
	必要な機材	21
	必要な試薬・消耗品	21
	作業手順	21
B.4	PCR 産物濃度均一化用磁気ビーズ液の調製	21
	必要な機材	21
	必要な試薬・消耗品	21
	作業手順	21

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「本体から排出された DNA」、メタゲノム DNA を「本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。

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。

1.3 水からの濾過採集方法

1.3.1 濾過フィルターと濾過方法と固定方法の選定

1.3.2 濾過関連機材の塩素漂白の方法

必要な機材

-

必要な消耗品

-

作業手順

- 1.

1.3.3 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

-

必要な消耗品

-

作業手順

- 1.

1.3.4 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

-

必要な消耗品

-

作業手順

- 1.

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防止

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

2.3 DNA 抽出

2.3.1 47mm グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出プロトコル

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.3.2 47mm 非グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出プロトコル

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.3.3 ステリベクスからの DNA 抽出プロトコル

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.3.4 磁気ビーズを用いた DNA 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 ライブラリ調製

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.1 プライマーの設計と発注の方法

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.2 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

-

作業手順

- 1.

2.4.3 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.

2.4.4 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.

2.4.5 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.

2.4.6 Exonuclease I 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 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.

2.4.8 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.

2.4.9 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.

2.4.10 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

付録 A

DNA 採集関連機材の自作

A.1 塩素漂白・塩素抜き器の作成

必要な機材

-

必要な部材

-

作業手順

- 1.

A.2 車載用吸引ポンプユニットの作成

必要な機材

-

必要な部材

-

作業手順

- 1.

A.3 吸引濾過装置の作成

必要な機材

-

必要な部材

-

作業手順

- 1.

付録 B

試薬の調製

B.1 DNA・RNA 固定液の調製

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

B.2 DNA 抽出用試薬の調製

B.2.1 Insect Lysis Buffer

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

B.2.2 Column Binding Buffer

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

B.2.3 Wash Buffer

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

B.3 PCR 産物精製用磁気ビーズ液の調製

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

B.4 PCR 産物濃度均一化用磁気ビーズ液の調製

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.