



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 8 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	15
必要な機材	15
必要な試薬・消耗品	15
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	17
作業手順	17

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	19
	必要な機材	19
	必要な試薬・消耗品	19
	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	21
	必要な機材	21
	必要な試薬・消耗品	21
	作業手順	22
2.3.5	Sterivex 固定液入サンプルからの DNA 抽出プロトコル	23
	必要な機材	23
	必要な試薬・消耗品	23
	作業手順	24
2.3.6	磁気ビーズを用いた DNA の精製プロトコル	25
	必要な機材	25
	必要な試薬・消耗品	26
	作業手順	26
2.4	ライブラリ調製	26
2.4.1	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	26
2.4.2	プライマーの設計と発注の方法	27
	アダプター配列付きプライマー	27
	インデックス配列付きプライマー	28
2.4.3	アニーリング温度と DNA 合成酵素の決定	29
2.4.4	鋳型 DNA 希釈率の決定	30
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 (テスト用)	30
	必要な機材	30
	必要な試薬・消耗品	31
	作業手順	31
	PCR プログラム例	32
2.4.6	アガロースゲル電気泳動のプロトコル	32
	必要な機材	32
	必要な試薬・消耗品	33
	作業手順	33
2.4.7	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)	33
	必要な機材	33
	必要な試薬・消耗品	34
	作業手順	34
	PCR プログラム例	35
2.4.8	磁気ビーズを用いた PCR 産物の精製プロトコル	35
	必要な機材	35
	必要な試薬・消耗品	36
	作業手順	36
2.4.9	磁気ビーズを用いた PCR 産物の濃度均一化プロトコル	37

必要な機材	37
必要な試薬・消耗品	37
作業手順	37
2.4.10 Exonuclease I を用いた PCR 産物の精製プロトコル	38
必要な機材	38
必要な試薬・消耗品	38
作業手順	38
2.4.11 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	39
必要な機材	39
必要な試薬・消耗品	39
作業手順	39
PCR プログラム	40
2.4.12 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	41
必要な機材	41
必要な試薬・消耗品	41
作業手順	41
2.4.13 E-Gel SizeSelect によるサイズ選択	41
必要な機材	41
必要な試薬・消耗品	42
作業手順	42
2.5 ライブラリのクオリティチェック	42
2.5.1 Qubit による濃度測定と希釈	42
必要な機材	42
必要な試薬・消耗品	43
作業手順	43
2.5.2 Bioanalyzer による電気泳動	43
必要な機材	43
必要な試薬・消耗品	43
作業手順	43
2.6 MiSeq によるシーケンス	43
必要な機材	43
必要な試薬・消耗品	43
作業手順	43
引用文献	46
付録 A DNA 採集関連機材の自作	47
A.1 漂白剤抜き器の作成	47
必要な機材	47
必要な部材	47
作業手順	47
A.2 車載用吸引ポンプユニットの作成	48

	必要な機材	48
	必要な部材	48
	作業手順	48
A.3	吸引濾過装置の作成	49
	必要な機材	49
	必要な部材	49
	作業手順	49
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	50
	必要な機材	50
	必要な部材	50
	作業手順	50
付録 B	試薬の調製	51
B.1	DNA・RNA 固定液の調製	51
B.1.1	1M クエン酸ナトリウム	51
	必要な機材	51
	必要な試薬・消耗品	51
	作業手順	52
B.1.2	DNA・RNA 固定液	52
	必要な機材	52
	必要な試薬・消耗品	52
	作業手順	52
B.2	DNA 抽出用試薬の調製	53
B.2.1	IDTE	53
	必要な機材	53
	必要な試薬・消耗品	53
	作業手順	53
B.2.2	1M NaCl	54
	必要な機材	54
	必要な試薬・消耗品	54
	作業手順	54
B.2.3	0.1M Tris-HCl pH6.4	54
	必要な機材	54
	必要な試薬・消耗品	55
	作業手順	55
B.2.4	Insect Lysis Buffer	55
	必要な機材	55
	必要な試薬・消耗品	55
	作業手順	56
B.2.5	Column Binding Buffer	56
	必要な機材	56
	必要な試薬・消耗品	56

	作業手順	56
B.2.6	Wash Buffer 1	57
	必要な機材	57
	必要な試薬・消耗品	57
	作業手順	57
B.2.7	Wash Buffer 2	57
	必要な機材	57
	必要な試薬・消耗品	58
	作業手順	58
B.3	PCR 用 10x ローディングダイの調製	58
	必要な機材	58
	必要な試薬・消耗品	59
	作業手順	59
B.4	PCR 産物精製用磁気ビーズ (MagNA) 液の調製	59
	必要な機材	59
	必要な試薬・消耗品	59
	作業手順	60
B.5	PCR 産物濃度均一化用磁気ビーズ (BeNUS) 液の調製	60
	必要な機材	60
	必要な試薬・消耗品	61
	作業手順	61
付録 C	インデックスプライマー配列	63

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、ある場の植物相に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、植物相に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ンカラム) 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

- 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)
- 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
- 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: 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、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. シリンジにピーカーから水試料 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。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

ここでは、自作バッファーと単体販売されているスピンカラムを組み合わせたDNA抽出方法を説明します。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。

2.3.1 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: 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

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: 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
- サンプル

作業手順

1. 恒温槽またはインキュベータを 56℃ 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. サンプルを用意する
6. 1.5mL チューブに仮ラベルを振って、4 を 200 μ 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 1.5mL チューブの蓋を開ける
9. サンプルを 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 μ L と 99.5% エタノール 200 μ 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 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)
16. インキュベートが 1 時間経ったら、11 のチューブを 20 °C 6000 \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 μ L を新しいカラムに加える
17. カラムを 20 °C 6000 \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 μ L 加えて 20 °C 6000 \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 μ L 加えて 20 °C 20000 \times g で 3 分遠心する
20. エタノールを除去するため、20 °C 20000 \times g で更に 1 分遠心し、濾液を捨てる
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 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)
23. 20 °C 6000 \times g で 1 分遠心し、濾液を回収する
24. -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砕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 \times 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
- 100 μ L ピペット: 1 本
- 200 μ L ピペット: 1 本
- 1000 μ L ピペット: 1 本
- 10mL 電動ピペット エー・アンド・デイ 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: 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
- 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 μ L と 20mg/mL Proteinase-K 10 μ 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 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)
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)
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、先曲がりピンセットを外す

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. 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
15. 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 °C 20000 × 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、Binding Buffer 400μL と 99.5% エタノール 400μL 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 °C 6000 × 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 200μL 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)
26. 空カラムを 20 °C 20000 × 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 600μL を新しいカラムに加える
27. カラムを 20 °C 6000 × 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 °C 6000 × 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 °C 6000 × 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 °C 20000 × g で 3 分遠心する
32. エタノールを除去するため、20 °C 20000 × g で更に 1 分遠心し、濾液を捨てる
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る (1 サンプルごとにチップ交換)
35. 20 °C 6000 × g で 1 分遠心し、濾液を回収する
36. -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 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

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℃ 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 μ L と 20mg/mL Proteinase-K 10 μ 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 Binding Buffer 200 μ L をサンプル数倍 + 50 μ L 分注し、56℃ 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)
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、先曲がりピンセットを外す
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. 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
15. 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℃ 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
18. 空カラムに 4 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)
19. 56℃ 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 200 μ 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 μ L をサンプル数倍 + 50 μ L 分注し、56℃ 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℃ 6000 \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 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)
26. 空カラムを 20℃ 20000 \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 μ L を新しいカラムに加える
27. カラムを 20℃ 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℃ 6000 \times g で 1 分遠心し、濾液を捨てる
29. カラムに Wash Buffer 2 を 500 μ L 加えて 20℃ 20000 \times g で 3 分遠心する
30. エタノールを除去するため、20℃ 20000 \times g で更に 1 分遠心し、濾液を捨てる
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. 20 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℃ 6000 \times g で 1 分遠心し、濾液を回収する
34. -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。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 °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。

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: 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

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: 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: 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. 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 μ L、Insect Lysis Buffer 205 μ L と 20mg/mL Proteinase-K 20 μ 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 $^{\circ}$ 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)
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 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)
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 $^{\circ}$ C で 30 分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 μ 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 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)
15. 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
16. 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
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 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
18. カラムを 20 $^{\circ}$ C 6000 \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 μ L 加えて 20 $^{\circ}$ C 6000 \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 μ L 加えて 20 $^{\circ}$ C 20000 \times g で 3 分遠心する
21. エタノールを除去するため、20 $^{\circ}$ C 20000 \times g で更に 1 分遠心し、濾液を捨てる
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 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)
24. 20 $^{\circ}$ C 6000 \times g で 1 分遠心し、濾液を回収する
25. -20 $^{\circ}$ C 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 200 μ L 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 200 μ L と 20mg/mL Proteinase-K 20 μ L 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 $^{\circ}$ 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、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: 1 台
- 1.5/2mL チューブ 20000 \times g 対応遠心機: 1 台
- 15mL 遠沈管 4000 \times 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
- 100 μ L ピペット: 1 本
- 200 μ L ピペット: 1 本
- 1000 μ L ピペット: 1 本
- 10mL 電動ピペット エー・アンド・デイ 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
- 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
- IDTE: 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. 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 μ L、20mg/mL Proteinase-K 20 μ 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 °C 4000 × 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 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)
9. Sterivex の入口側キャップを取り付け、20 °C 4000 × 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 μ 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 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)
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 30 分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 μ 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 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)

20. 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
21. Sterivex + 3mL 丸底テストチューブを 20 °C 4000 × 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 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
23. カラムを 20 °C 6000 × 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 500μL 加えて 20 °C 6000 × 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 500μL 加えて 20 °C 20000 × g で 3 分遠心する
26. エタノールを除去するため、20 °C 20000 × g で更に 1 分遠心し、濾液を捨てる
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 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)
29. 20 °C 6000 × g で 1 分遠心し、濾液を回収する
30. -20 °C 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 °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、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。

2.3.6 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非常に手間がかかるので、筆者はあまりこの方法は使用していません。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 (強力なネオジウム磁石があれば、チューブラックの横に貼る程度でよい): 1 台
- 10mL 電動ピペット エー・アンド・デイ 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): 100 μ L
- サンプル DNA 溶液: 100 μ L
- IDTE: 100 μ L
- 70% エタノール: 1800 μ 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 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 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 (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 $^{\circ}$ 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. 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 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 0.2 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。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エーターを強く押し付けても簡単には破れません。

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 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ください。迷ったときは Applied Biosystems のもの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るはずです。

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 μ 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 μ 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。

2.4.2 プライマーの設計と発注の方法

Illumina のシーケンサ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 (どちらも構いません)。

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 に依頼してください。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。

アダプター配列付きプライマー

Illumina のシーケンサ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、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。

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、増幅産物の長さに変異を持たせます。

```
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 GTAAAACTCGTGCCAGC - 3'
5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG NNNNNN HVWMGT CGGTAAAACTCGTGCCAGC - 3'
5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG NNNNNN HVWMWM GTCGTA AAAACTCGTGCCAGC - 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)。

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・リバーズ各 24 セット (Set A–X) 作成したものを付録 C に掲載しました。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 本とリバーズの 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。組み合わせる際は、A どうし、B どうし・・・X どうしで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-B, B-C, B-D (A-C, A-D, B-A, B-B が未使用) の組み合わせで使用します。

なお、Illumina のシーケンサ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 50μM の濃度で納品していただくのがよいでしょう。これは、100μM 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。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)。

2.4.3 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 T_m 値に基づいて決定します。したがって、T_m 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ル温度を設定する必要があります。どの程度アニール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 Tm 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 Tm 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 Tm 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 Tm 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 Tm 値を参考にするといいでしょう。

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。この他、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。

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。

2.4.4 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 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。クルー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ことが多いです。

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 (テスト用)

必要な機材

- 20 μ 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 μ 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
- 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 μ L / 1 ウェル
- 5x Q5 Reaction Buffer: 2.5 μ L / 1 ウェル
- 5x Q5 High GC Enhancer: 2.5 μ L / 1 ウェル
- 10mM dNTPs: 0.25 μ L / 1 ウェル
- 10 μ M フォワードプライマー: 0.6 μ L / 1 ウェル
- 10 μ M リバースプライマー: 0.6 μ L / 1 ウェル
- SPW: 4.2 μ L / 1 ウェル
- Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (2U/ μ L): 0.1 μ L / 1 ウェル
- 鋳型 DNA 溶液: 3.5 μ L / 1 サンプル
- 8 連チューブ: 12/8 本 / 4 サンプル
- SPW: 14 μ L / 1 サンプル
- SPW: 5 μ L / 1 サンプル
- SPW: 7.5 μ 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 μ L、5x Q5 Reaction Buffer 2.5 μ L、5x Q5 High GC Enhancer 2.5 μ L、10mM dNTPs 0.25 μ L、10 μ M フォワードプライマー 0.6 μ L、10 μ M リバースプライマー 0.6 μ L、SPW 4.2 μ 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 μ L 電動ピペットで 14 μ L ずつ分注する
4. 鋳型 DNA 溶液 3.5 μ L を 3 の SPW に加えることで 5 倍希釈液 17.5 μ L を作る
5. 5 倍希釈液の隣の 4 ウェルに SPW を 20 μ L 電動ピペットで 5 μ L ずつ分注する
6. 5 倍希釈液 5 μ L を 5 の SPW に加えることで 10 倍希釈液 10 μ L を作る
7. 10 倍希釈液の隣の 4 ウェルに SPW を 20 μ L 電動ピペットで 7.5 μ L ずつ分注する
8. 5 倍希釈液 2.5 μ L を 7 の SPW に加えることで 20 倍希釈液 10 μ 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 ウェルプレートを置く
11. 2 に Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2U/ μ L) 0.1 μ 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 μ L 電動ピペットで 12 μ L ずつ分注する
13. 96 ウェルプレートの 1 列 (8 ウェル) に鋳型 5・10・20 倍希釈液を 20 μ L 電動ピペットで 1 μ 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ブ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 °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 (46 回・47 サイクル)
6. 72 °C 10min
7. 10 °C

Pipetty TLIC01-250 で 20 μ 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 μ L では 0.3 μ L 程度、10–15 μ L では 0.2 μ L 程度、15–20 μ L では 0.1 μ 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 μ 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 μ L 多めにしています。

96 ウェルプレートを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。

2.4.6 アガロースゲル電気泳動のプロトコル

必要な機材

- 20 μ 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
- 12 連 10 μ 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

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 μ L
- ニッポンジーン アガロース S: 1.6g
- ローディングダイ入 PCR 産物: 6 μ L
- ラダーマーカー: 16 μ 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 S 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 μ 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、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 μ L 吸い取り、そのままゲルにアプライする
9. ラダーマーカーを 20 μ L 電動ピペットで 4 μ 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 UV トランスイルミネータで泳動像を確認する

10 連ピペットに装着する 10 μ 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。

2.4.7 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 μ 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 μ L を鋳型として使用しています。

必要な機材

- 20 μ 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 μ 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

- 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 μ L / 1 ウェル
- 5x Q5 High GC Enhancer: 2.5 μ L / 1 ウェル
- 10mM dNTPs: 0.25 μ L / 1 ウェル
- 10 μ M フォワードプライマー: 0.6 μ L / 1 ウェル
- 10 μ M リバースプライマー: 0.6 μ L / 1 ウェル
- SPW: 4.45 μ L / 1 ウェル
- Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (2U/ μ L): 0.1 μ L / 1 ウェル
- 鋳型 DNA 溶液: 1.8 μ L / 1 サンプル
- 8 連チューブ: 12/8 本 / 12 サンプル
- SPW: 16.2 μ 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 μ L、5x Q5 High GC Enhancer 2.5 μ L、10mM dNTPs 0.25 μ L、10 μ M フォワードプライマー 0.6 μ L、10 μ M リバースプライマー 0.6 μ L、SPW 4.45 μ 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 μ L 電動ピペットで 16.2 μ L ずつ分注する
4. 鋳型 DNA 溶液 1.8 μ L を 3 の SPW に加えることで 10 倍希釈液 18 μ 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 ウェルプレートを置く
7. 2 に Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2U/ μ L) 0.1 μ 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 μ L 電動ピペットで 11 μ L ずつ分注する
9. 96 ウェルプレートの 1 列 (8 ウェル) に鋳型 10 倍希釈液を 20 μ L 電動ピペットで 2 μ 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. スピンドア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 μ 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 μ L では 0.3 μ L 程度、10–15 μ L では 0.2 μ L 程度、15–20 μ L では 0.1 μ 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 μ 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 μ 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。

2.4.8 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 未満の増幅産物を除去すると仮定しています。200bp 未満を除去したい場合は 40 μ L、250bp 未満を除去したい場合は 36 μ L、400bp 未満を除去したい場合は 28 μ L、500bp 未満を除去したい場合は 26 μ L の MagNA 液を使用してください。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 μ L 電動ピペット Eppendorf Xplorer Plus 4861000791 または Sartorius Picus 735441: 1 本
- 200 μ 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
- 1000 μ L 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 100 μ L ピペット: 1 本
- 12 連 200 μ L ピペット: 1 本
- 96 ウェルプレート用磁気スタンド: 1 台

- 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 枚 / 96 サンプル
- プレートシール: 1 枚 / 96 サンプル
- MagNA 液 (作成方法は付録 B.4 を参照): 32 μ L / 1 サンプル
- PCR 産物: 40 μ L (8 レプリケート各 5 μ L) / 1 サンプル \times 96 サンプル
- IDTE: 42 μ L / 1 サンプル
- 70% エタノール: 300 μ L / 1 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 μ L 電動ピペットで 32 μ L ずつ分注する
4. 12 連 100 μ 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 μ L ずつ吸引し、合計 40 μ 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. 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
9. ビーズに触れないよう注意して溶液を 12 連 100 μ L ピペットで吸い取って捨てる
10. 磁気スタンドに立てたまま、1000 μ L 電動ピペットで 70% エタノールを 150 μ L ずつ加える
11. エタノールを 12 連 200 μ L ピペットで吸い取って捨てる
12. 磁気スタンドに立てたまま、1000 μ L 電動ピペットで 70% エタノールを 150 μ L ずつ加える
13. エタノールを 12 連 200 μ L ピペットで吸い取って捨てる (できるだけ除去)
14. 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)
15. IDTE を 200 μ L 電動ピペットで 42 μ L ずつ加えてプレートシールをしっかりと貼る
16. 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)
17. 500 \times g で 5 秒遠心してスピンドウン
18. サーマルサイクラーにセットして 37 $^{\circ}$ C で 5 分インキュベート
19. 冷蔵庫に一時保管 (1 ヶ月以上の長期の場合は冷凍庫へ)

磁気ビーズは長期間でなければ入れっぱなしで構いません。

2.4.9 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。

必要な機材

- 200 μ 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
- 1000 μ L 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 100 μ L ピペット: 1 本
- 12 連 200 μ L ピペット: 1 本
- 96 ウェルプレート用磁気スタンド: 1 台
- 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 枚 / 96 サンプル
- プレートシール: 1 枚 / 96 サンプル
- BeNUS 液 (作成方法は付録 B.5 を参照): 40 μ L / 1 サンプル
- イソプロパノール 分子生物学用: 40 μ L / 1 サンプル
- 磁気ビーズ精製済み PCR 産物: 40 μ L / 1 サンプル \times 96 サンプル
- IDTE: 20 μ L / 1 サンプル
- 70% エタノール: 150 μ L / 1 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 μ L 電動ピペットで 40 μ L ずつ分注する
4. 12 連 100 μ 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 μ 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. 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
9. ビーズに触れないよう注意して溶液を 12 連 200 μ L ピペットで吸い取って捨てる
10. 磁気スタンドに立てたまま、1000 μ L 電動ピペットで 70% エタノールを 150 μ L ずつ加える

11. エタノールを12連200 μ Lピペットで吸い取って捨てる(できるだけ除去)
12. 磁気スタンドから外して20℃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 μ L電動ピペットで20 μ 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℃で5分インキュベート
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)

磁気ビーズは長期間でなければ入れっぱなしで構いません。

2.4.10 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 μ L電動ピペット Eppendorf Xplorer Plus 4861000791 または Sartorius Picus 735441: 1本
- 20 μ 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/ μ L: 0.4 μ L/1サンプル
- SPW: 3.6 μ L/1サンプル
- PCR産物: 40 μ L(8レプリケート各5 μ L)/1サンプル × 96サンプル

作業手順

1. 1.5mLチューブにExonuclease I 20U/ μ L 40 μ LとSPW 360 μ 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/ μ Lを20 μ L電動ピペットで4 μ Lずつ分注する
3. 12連100 μ 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 μ Lずつ吸引し、合計40 μ 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 °C 90 分、80 °C 15 分処理する
6. 終わったら十分冷めるまで待って、96 ウェルプレートを実験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. スピンドア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)

2.4.11 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

- 12 連 10μL 電動ピペット Eppendorf Xplorer 4861000112 または Sartorius Picus 735421: 1 本
- 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
- 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: 2.5μL / 1 ウェル
- 5x Q5 High GC Enhancer: 2.5μL / 1 ウェル
- 10mM dNTPs: 0.25μL / 1 ウェル
- SPW: 3.25μL / 1 ウェル
- Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (2U/μL): 0.1μL / 1 ウェル
- 8 連チューブ: 1 本 / 1 プレート
- 50μM フォワードインデックスプライマー: 1.68μL / 12 ウェル × 8 種類
- SPW: 15.1μL / 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
- 50μM リバースインデックスプライマー: 1.2μL / 8 ウェル × 12 種類
- SPW: 10.8μL / 1 リバースインデックスプライマー
- PCR 産物: 2μL / 1 サンプル × 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アウン

2. 1.5mL チューブに 5x Q5 Reaction Buffer 2.5 μ L、5x Q5 High GC Enhancer 2.5 μ L、10mM dNTPs 0.25 μ L、SPW 3.25 μ 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 1 本を用意し、8 ウェルに SPW を 200 μ L 電動ピペットで 15.1 μ L ずつ分注する
4. 50 μ 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 μ L 電動ピペットで 10.8 μ L ずつ分注する
6. 50 μ 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 ウェルプレート置く
8. 2 に Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2U/ μ L) 0.1 μ 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 μ L 電動ピペットで 8.6 μ 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 μ M リバースインデックスプライマーを 12 連 10 μ L 電動ピペットで 1.2 μ 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 μ M フォワードインデックスプライマーを 20 μ L 電動ピペットで 1.2 μ 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 μ L を 12 連 10 μ 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 $^{\circ}$ 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 (11 回 \cdot 12 サイクル)
6. 72 $^{\circ}$ C 10min
7. 10 $^{\circ}$ C

Pipetty TLIC01-250 で 20 μ 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 μ L では 0.3 μ L 程度、10–15 μ L では 0.2 μ L 程度、15–20 μ L では 0.1 μ 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 μ 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 μ 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。

2.4.12 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 μ L 電動ピペット Eppendorf Xplorer Plus 4861000791 または Sartorius Picus 735441: 1 本
- 1000 μ 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 μ 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 μ L ずつ吸引し、合計 80 μ 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 μ 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)

2.4.13 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。

必要な機材

- 200 μ 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
- 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

- ボルテックスミキサー: 1 台

必要な試薬・消耗品

- 0.2mL チューブ: 2 本
- MagNA 液 (作成方法は付録 B.4 を参照): 80 μ L / 1 レプリケート
- ライブラリ溶液: 100 μ L \times 2 レプリケート
- SPW: 22 μ L / 1 レプリケート
- 70% エタノール: 300 μ L / 1 レプリケート

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. 0.2mL チューブ 2 本に MagNA 液を 200 μ L 電動ピペットで 80 μ L ずつ分注する
4. 0.2mL チューブ 2 本にライブラリ溶液を 200 μ L 電動ピペットで 100 μ L ずつ分注する
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 μ 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 μ L 電動ピペットで 70% エタノールを 150 μ L ずつ加える
10. エタノールを 200 μ 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 μ L 電動ピペットで 70% エタノールを 150 μ L ずつ加える
12. エタノールを 200 μ 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 μ L 電動ピペットで 22 μ 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. E-Gel

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**: 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.
- 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.
- 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

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 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 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 ピペット: 1 本
- 1000 μ 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 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 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 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 ピペット: 1 本
- 1000 μ L 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
- 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 ピペット: 1 本
- 1000 μ L 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 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ください。

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

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 ピペット: 1 本
- 1000 μ 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 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 ピペット: 1 本

- 1000 μ 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 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

付録 C

インデックスプライマー配列

表 C.1: フォワードインデックスプライマー

Set	Name	Sequence
A	F001-AACCTCTC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAACCTCTCTCGTCGGCAGCGTC
	F002-CGATGGTA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGATGGTATCGTCGGCAGCGTC
	F003-TGAAGTCG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGAAGTCGTCGTCGGCAGCGTC
	F004-TCCATGGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCCATGGTTCGTCGGCAGCGTC
	F005-CTTCAACC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTTCAACCTCGTCGGCAGCGTC
	F006-CAAGTCAT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAAGTCATTCGTCGGCAGCGTC
	F007-GTGACTCT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTGACTCTTCGTCGGCAGCGTC
	F008-ACTGGAAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACTGGAACCTCGTCGGCAGCGTC
B	F009-AACCTAGG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAACCTAGGTCGTCGGCAGCGTC
	F010-CTGTGTAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTGTGTACTCGTCGGCAGCGTC
	F011-TGGAGACA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGGAGACATCGTCGGCAGCGTC
	F012-ATGGAAGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATGGAAGATCGTCGGCAGCGTC
	F013-GATCACCA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGATCACCATCGTCGGCAGCGTC
	F014-GTCTCGTT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTCTCGTTTCGTCGGCAGCGTC
	F015-CCTACGTT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCCTACGTTTCGTCGGCAGCGTC
	F016-ACACACAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACACACACTCGTCGGCAGCGTC
C	F017-TGCAAGGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGCAAGGATCGTCGGCAGCGTC
	F018-TGTCTTGG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGTCTTGGTCGTCGGCAGCGTC
	F019-CTTCACAT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTTCACATTCGTCGGCAGCGTC
	F020-GAACACGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGAACACGTTTCGTCGGCAGCGTC
	F021-GGATGTCT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGATGTCTTCGTCGGCAGCGTC
	F022-GTAGGAAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTAGGAAGTCGTCGGCAGCGTC
	F023-TCCTCATC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCCTCATCTCGTCGGCAGCGTC
	F024-AAGAGGAA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAAGAGGAATCGTCGGCAGCGTC
D	F025-AGGTTGAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGGTTGAGTCGTCGGCAGCGTC
	F026-ACACGATC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACACGATCTCGTCGGCAGCGTC
	F027-GAACGTAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGAACGTAGTCGTCGGCAGCGTC
	F028-TCAGACGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCAGACGATCGTCGGCAGCGTC
	F029-CTGTCTCA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTGTCTCATCGTCGGCAGCGTC
	F030-TCTGAAGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTGAAGTTCGTCGGCAGCGTC
	F031-AACACAAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAACACAAGTCGTCGGCAGCGTC
	F032-TTCTCCTA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTTCTCTATCGTCGGCAGCGTC

次ページに続く

前ページからの続き

Set	Name	Sequence
E	F033-CCTACAAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCCTACAAGTCGTCGGCAGCGTC
	F034-TAGTGACT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGTGACTTCGTCGGCAGCGTC
	F035-AGTACGTA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGTACGTATCGTCGGCAGCGTC
	F036-TTGCATCC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTTGCATCCTCGTCGGCAGCGTC
	F037-CTTGAAGG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTTGAAGGTCGTCGGCAGCGTC
	F038-GCACTTGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCACTTGTTTCGTCGGCAGCGTC
	F039-AACCAGAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAACCAGAGTCGTCGGCAGCGTC
	F040-ACCATCCA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACCATCCATCGTCGGCAGCGTC
F	F041-GCTTGTGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTGTGTTTCGTCGGCAGCGTC
	F042-TGTCAAGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGTCAAGCTCGTCGGCAGCGTC
	F043-ATCTCACC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATCTCACCTCGTCGGCAGCGTC
	F044-ATCAGAGG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATCAGAGGTCGTCGGCAGCGTC
	F045-CGAGTGAA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGAGTGAATCGTCGGCAGCGTC
	F046-CAGAGCTT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAGAGCTTTCGTCGGCAGCGTC
	F047-CTAGAGAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTAGAGACTCGTCGGCAGCGTC
	F048-AACGACTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAACGACTGTTCGTCGGCAGCGTC
G	F049-GATCATGG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGATCATGGTCGTCGGCAGCGTC
	F050-ACGATGAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACGATGACTCGTCGGCAGCGTC
	F051-TTGGTCCA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTTGGTCCATCGTCGGCAGCGTC
	F052-ACCTGATG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACCTGATGTCGTCGGCAGCGTC
	F053-CGATGTAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGATGTAGTCGTCGGCAGCGTC
	F054-CTTCTCTC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTTCTCTCTCGTCGGCAGCGTC
	F055-ACAGCTGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACAGCTGTTCGTCGGCAGCGTC
	F056-GATCAGTC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGATCAGTCTCGTCGGCAGCGTC
H	F057-CTGTTTCA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTGTTTCACTCGTCGGCAGCGTC
	F058-TGTCGTCT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGTCGTCTTCGTCGGCAGCGTC
	F059-TGAACACC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGAACACCTCGTCGGCAGCGTC
	F060-CTTGTGAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTTGTGAGTCGTCGGCAGCGTC
	F061-ACTGCACA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACTGCACATCGTCGGCAGCGTC
	F062-CAACACTC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAACACTCTCGTCGGCAGCGTC
	F063-TACGTGGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTACGTGGATCGTCGGCAGCGTC
	F064-GTGAGTTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTGAGTTGTTCGTCGGCAGCGTC
I	F065-TGAGTCCT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGAGTCCTTCGTCGGCAGCGTC
	F066-CACTCCAA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCACTCCAATCGTCGGCAGCGTC
	F067-AGGACTGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGGACTGTTCGTCGGCAGCGTC
	F068-GAGTGTGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGAGTGTGATCGTCGGCAGCGTC
	F069-TGTTGCTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGTTGCTGTTCGTCGGCAGCGTC
	F070-ACAGAAGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACAGAAGCTCGTCGGCAGCGTC
	F071-CTCCAGTT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTCCAGTTTCGTCGGCAGCGTC
	F072-TAGACTAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGACTACTCGTCGGCAGCGTC
J	F073-TTGTGAAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTTGTGAAGTCGTCGGCAGCGTC
	F074-TACACAGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTACACAGCTCGTCGGCAGCGTC
	F075-CTTGCATC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTTGCATCTCGTCGGCAGCGTC
	F076-CGTGTTCT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGTGTTCTTCGTCGGCAGCGTC
	F077-TCGTTTCA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTTTCGATCGTCGGCAGCGTC
	F078-GTTCTGTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTCTGTGTCGTCGGCAGCGTC
	F079-AACCACGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAACCACGATCGTCGGCAGCGTC
	F080-ACAACCTCA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACAACCTCATCGTCGGCAGCGTC

次ページに続く

前ページからの続き

Set	Name	Sequence
K	F081-TGAAGCAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGAAGCACTCGTCGGCAGCGTC
	F082-TAGGATGG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGGATGGTCGTCGGCAGCGTC
	F083-CTGAGACT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTGAGACTTCGTCGGCAGCGTC
	F084-GTCACAGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTCACAGATCGTCGGCAGCGTC
	F085-TCTGTCAA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTGTCAATCGTCGGCAGCGTC
	F086-ACAGGTTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACAGGTTGTCGTCGGCAGCGTC
	F087-GTCTAGAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTCTAGAGTCGTCGGCAGCGTC
	F088-CACCTTGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCACCTTGATCGTCGGCAGCGTC
L	F089-ACCTGTCA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACCTGTCATCGTCGGCAGCGTC
	F090-TCACGAGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCAGAGTTCGTCGGCAGCGTC
	F091-GAACCTCA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGAACCTCATCGTCGGCAGCGTC
	F092-CATCAAGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCATCAAGTTCGTCGGCAGCGTC
	F093-CATGTCGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCATGTCGATCGTCGGCAGCGTC
	F094-AGCTCCTT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGCTCCTTTCGTCGGCAGCGTC
	F095-TTGGTGTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTTGGTGTCTCGTCGGCAGCGTC
	F096-ATGACTAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATGACTAGTCGTCGGCAGCGTC
M	F097-GAAGTTGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGAAGTTGATCGTCGGCAGCGTC
	F098-CAGATCCA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAGATCCATCGTCGGCAGCGTC
	F099-ATCCATCG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATCCATCGTCGTCGGCAGCGTC
	F100-CTCTACAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTCTACACTCGTCGGCAGCGTC
	F101-TACAGATG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTACAGATGTCGTCGGCAGCGTC
	F102-GGACAGTT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGACAGTTTCGTCGGCAGCGTC
	F103-TCTCCAAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTCCAACCTCGTCGGCAGCGTC
	F104-TGTACTGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGTACTGATCGTCGGCAGCGTC
N	F105-ACATCGTA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACATCGTATCGTCGGCAGCGTC
	F106-TGCAACAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGCAACAGTCGTCGGCAGCGTC
	F107-TACTGTAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTACTGTAGTCGTCGGCAGCGTC
	F108-CAACAGCT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAACAGCTTCGTCGGCAGCGTC
	F109-ATGATCGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATGATCGATCGTCGGCAGCGTC
	F110-GTCCATGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTCCATGATCGTCGGCAGCGTC
	F111-CATGGTTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCATGGTTGTCGTCGGCAGCGTC
	F112-TCGAGAAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGAGAACTCGTCGGCAGCGTC
O	F113-ATCGTCTT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATCGTCTTTCGTCGGCAGCGTC
	F114-TGACAACT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGACAACTTCGTCGGCAGCGTC
	F115-TCATCTCC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCATCTCCTCGTCGGCAGCGTC
	F116-GATGGTCA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGATGGTCATCGTCGGCAGCGTC
	F117-GATCTCAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGATCTCAGTCGTCGGCAGCGTC
	F118-CTGATGTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTGATGTGTCGTCGGCAGCGTC
	F119-TGAGAAGG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGAGAAGGTCGTCGGCAGCGTC
	F120-ACCTACAA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACCTACAATCGTCGGCAGCGTC
P	F121-CCACAGTA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCCACAGTATCGTCGGCAGCGTC
	F122-TGCTCTCA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGCTCTCATCGTCGGCAGCGTC
	F123-GTTCCTAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTCTACTCGTCGGCAGCGTC
	F124-CTAGGAGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTAGGAGATCGTCGGCAGCGTC
	F125-ATGTCCAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATGTCCACTCGTCGGCAGCGTC
	F126-AAGCTTGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAAGCTTGCTCGTCGGCAGCGTC
	F127-TAGATCTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGATCTGTCGTCGGCAGCGTC
	F128-CCTAGCAT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCCTAGCATTCGTCGGCAGCGTC

次ページに続く

前ページからの続き

Set	Name	Sequence
Q	F129-GCATCATG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCATCATGTCGTCGGCAGCGTC
	F130-CTCAACGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTCAACGTTTCGTCGGCAGCGTC
	F131-AAGCTCAA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAAGCTCAATCGTCGGCAGCGTC
	F132-TGTAGTTC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGTAGTTCTCGTCGGCAGCGTC
	F133-AAGGTCCT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAAGGTCCTTCGTCGGCAGCGTC
	F134-ACTTCAGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACTTCAGCTCGTCGGCAGCGTC
	F135-GGATCACA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGATCACATCGTCGGCAGCGTC
	F136-GGAAGGAA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGAAGGAATCGTCGGCAGCGTC
R	F137-AGTGCTAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGTGCTAGTCGTCGGCAGCGTC
	F138-AACAGGTC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAACAGGTCTCGTCGGCAGCGTC
	F139-CTCATCTA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTCATCTATCGTCGGCAGCGTC
	F140-CACTAGTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCACTAGTGTCGTCGGCAGCGTC
	F141-TCACATCG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCACATCGTCGTCGGCAGCGTC
	F142-GTACAAGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTACAAGCTCGTCGGCAGCGTC
	F143-CAGTGGAT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAGTGGATTTCGTCGGCAGCGTC
	F144-GGAAGAGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGAAGAGTTCGTCGGCAGCGTC
S	F145-GTACCTTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTACCTTGTCGTCGGCAGCGTC
	F146-TAGGTGAT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGGTGATTTCGTCGGCAGCGTC
	F147-TCGTACAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTACACTCGTCGGCAGCGTC
	F148-CTTGAGCA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTTGAGCATCGTCGGCAGCGTC
	F149-GGTTGAGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGTTGAGATCGTCGGCAGCGTC
	F150-ACAACAAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACAACAACCTCGTCGGCAGCGTC
	F151-AGCATCTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGCATCTGTCGTCGGCAGCGTC
	F152-AACATCGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAACATCGTTTCGTCGGCAGCGTC
T	F153-GCTCTCTT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCTCTTTTCGTCGGCAGCGTC
	F154-AGAGGTAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGAGGTACTCGTCGGCAGCGTC
	F155-TCTCACAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTCACAGTCGTCGGCAGCGTC
	F156-TCCAATTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCCAATTGTCGTCGGCAGCGTC
	F157-TGTTGGAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGTTGGACTCGTCGGCAGCGTC
	F158-CGAACTCT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGAACTCTTCGTCGGCAGCGTC
	F159-ATGAACTC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATGAACTCTCGTCGGCAGCGTC
	F160-GAACGAGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGAACGAGATCGTCGGCAGCGTC
U	F161-AACCAACC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAACCAACCTCGTCGGCAGCGTC
	F162-TGATCGTT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGATCGTTTCGTCGGCAGCGTC
	F163-ACCTTGGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACCTTGATCGTCGGCAGCGTC
	F164-CGTACTTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGTACTTGTCGTCGGCAGCGTC
	F165-TAGAGTGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGAGTGTTTCGTCGGCAGCGTC
	F166-AGATGCTC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGATGCTCTCGTCGGCAGCGTC
	F167-GCTGAGAT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGAGATTTCGTCGGCAGCGTC
	F168-GTTGCTGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTGCTGATCGTCGGCAGCGTC
V	F169-GGATGAAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGATGAACCTCGTCGGCAGCGTC
	F170-GCAGTGTA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCAGTGATCGTCGGCAGCGTC
	F171-ACGAACAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACGAACAGTCGTCGGCAGCGTC
	F172-TGAGGTGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGAGGTGTTTCGTCGGCAGCGTC
	F173-CACTGTCT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCACTGTCTTCGTCGGCAGCGTC
	F174-ATGGTACC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATGGTACCTCGTCGGCAGCGTC
	F175-ATGTCAGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATGTCAGTTTCGTCGGCAGCGTC
	F176-CATCTGTA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCATCTGTATCGTCGGCAGCGTC

次ページに続く

前ページからの続き

Set	Name	Sequence
W	F177-GGTTCGAA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGTTCGAATCGTCGGCAGCGTC
	F178-ATGCTCTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATGCTCTGTCGTCGGCAGCGTC
	F179-GTCGTA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTCGTA
	F180-CGAGACTT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGAGACTTTCGTCGGCAGCGTC
	F181-TACTCTGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTACTCTGTTCGTCGGCAGCGTC
	F182-GAGAGAAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGAGAGAAGTCGTCGGCAGCGTC
	F183-TTCCTAGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTTCTAGCTCGTCGGCAGCGTC
	F184-TCGTGGAA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTGGAAATCGTCGGCAGCGTC
X	F185-ACACAACA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACAACAATCGTCGGCAGCGTC
	F186-TAGCTCGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGCTCGTTCGTCGGCAGCGTC
	F187-TCGTAGTG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTAGTGTCGTCGGCAGCGTC
	F188-GAAGCTTC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGAAGCTTCTCGTCGGCAGCGTC
	F189-AGTGAGGT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGTGAGGTTCGTCGGCAGCGTC
	F190-GCTAGTAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTAGTACTCGTCGGCAGCGTC
	F191-GAACCAAC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGAACCAACTCGTCGGCAGCGTC
	F192-CTCTCTAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTCTCTAGTCGTCGGCAGCGTC

表 C.2: リバースインデックスプライマー

Set	Name	Sequence
A	R001-TTGCAGGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTGCAGGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R002-CAAGGAAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAAGGAACGTCTCGTGGGCTCGG
	R003-AGATCTGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGATCTGGGTCTCGTGGGCTCGG
	R004-TCACACTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCACACTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R005-GATCATGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATCATGGGTCTCGTGGGCTCGG
	R006-AGACATGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGACATGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R007-ACCACGAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACCACGAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R008-TACGTTCC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACGTTCCGTCTCGTGGGCTCGG
	R009-GACTGACA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGACTGACAGTCTCGTGGGCTCGG
	R010-GTGATCTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGATCTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R011-CGTTCAAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTTCAACGTCTCGTGGGCTCGG
	R012-CTGACCAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGACCAAGTCTCGTGGGCTCGG
B	R013-GTGAGTTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGAGTTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R014-AGTCTGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGTCTGTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R015-AACCAACC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAACCAACCGTCTCGTGGGCTCGG
	R016-AGTGTGCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGTGTGCAGTCTCGTGGGCTCGG
	R017-CATGTCGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATGTGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R018-CGAGACTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGAGACTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R019-GCATCATG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCATCATGGTCTCGTGGGCTCGG
	R020-CACTTGGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCACTTGGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R021-GTGTGCAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGTGCAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R022-TCTCCAAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTCCAACGTCTCGTGGGCTCGG
	R023-GTGACAAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGACAACGTCTCGTGGGCTCGG
	R024-TCATGTGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCATGTGGGTCTCGTGGGCTCGG
C	R025-ATGGTGGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATGGTGGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R026-AGTCGTTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGTCGTTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R027-CACCTTGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCACCTTGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R028-CAACAGCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAACAGCTGTCTCGTGGGCTCGG

次ページに続く

前ページからの続き

Set	Name	Sequence
	R029-TCAACCAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCAACCATGTCTCGTGGGCTCGG
	R030-TTCATCCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTTCATCCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R031-CTCACATG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTCACATGGTCTCGTGGGCTCGG
	R032-GTGTACTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGTACTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R033-TACTCACG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACTCACGGTCTCGTGGGCTCGG
	R034-GAAGTACC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAAGTACCGTCTCGTGGGCTCGG
	R035-TCGAGAAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCGAGAACGTCTCGTGGGCTCGG
	R036-GGTGAGTA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGTGAGTAGTCTCGTGGGCTCGG
D	R037-GTCCATGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTCCATGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R038-TGGAGACA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGGAGACAGTCTCGTGGGCTCGG
	R039-AGTACACG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGTACACGGTCTCGTGGGCTCGG
	R040-TGATCGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGATCGTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R041-GTTGGAGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTTGGAGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R042-CATGACAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATGACAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R043-TGTCGTCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGTCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R044-TCAGTCTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCAGTCTCGTCTCGTGGGCTCGG
	R045-ACCTGTCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACCTGTCACTCGTGGGCTCGG
	R046-GAAGCTTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAAGCTTCGTCTCGTGGGCTCGG
	R047-CTGCTGAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGCTGATGTCTCGTGGGCTCGG
	R048-ATGTCCAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATGTCCACGTCTCGTGGGCTCGG
E	R049-ATCGACCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCGACCAGTCTCGTGGGCTCGG
	R050-GTTCCTAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTTCTCTCGTGGGCTCGG
	R051-CTTGAAGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTTGAAGGGTCTCGTGGGCTCGG
	R052-ACACCTAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACACCTAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R053-TGCAACAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGCAACAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R054-TCGTTTCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCGTTTCACTCGTGGGCTCGG
	R055-ACCACAGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACCACAGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R056-CTTGCATC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTTGCATCGTCTCGTGGGCTCGG
	R057-TCTTGGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTTGGTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R058-GGATGTCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGATGTCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R059-CAAGTGTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAAGTGTCGTCTCGTGGGCTCGG
	R060-AAGAAGGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGAAGGTGTCTCGTGGGCTCGG
F	R061-TCGATGCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCGATGCAGTCTCGTGGGCTCGG
	R062-GAGTGTGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAGTGTGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R063-CCTACGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCCTACGTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R064-GGAACTAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAACTACGTCTCGTGGGCTCGG
	R065-GTCTAGAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTCTAGAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R066-AGACTACC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGACTACCGTCTCGTGGGCTCGG
	R067-TCCACACA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCCACACAGTCTCGTGGGCTCGG
	R068-GAACGTAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAACGTAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R069-TAGGATGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTAGGATGGGTCTCGTGGGCTCGG
	R070-TCAGACGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCAGACGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R071-CTTGTGAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTTGTGAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R072-AAGCACTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAAGCACTTGTCTCGTGGGCTCGG
G	R073-TCTGGTAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTGGTAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R074-GATCTCAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATCTCAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R075-CAACCTGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAACCTGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R076-ATCTCACC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCTCACCCTCTCGTGGGCTCGG

次ページに続く

前ページからの続き

Set	Name	Sequence
	R077-ACAACTCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACAACTCAGTCTCGTGGGCTCGG
	R078-GTAGAGGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTAGAGGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R079-AGAGGACA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGAGGACAGTCTCGTGGGCTCGG
	R080-TGGATCAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGGATCATGTCTCGTGGGCTCGG
	R081-TACTACTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACTACTCGTCTCGTGGGCTCGG
	R082-CAGTGATG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAGTGATGGTCTCGTGGGCTCGG
	R083-GTCAAGCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTCAAGCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R084-TTCTGAGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCTGAGAGTCTCGTGGGCTCGG
H	R085-GATGTGCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATGTGCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R086-TCGAACTA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTGAACTAGTCTCGTGGGCTCGG
	R087-ACGTCTGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGTCTGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R088-CATCGAAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATCGAAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R089-AGAACGAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGAACGAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R090-ACAGACCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACAGACCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R091-CACAGTAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCACAGTACGTCTCGTGGGCTCGG
	R092-TTCCTAGC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCTCCTAGCGTCTCGTGGGCTCGG
	R093-TGGTCAGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGGTCAGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R094-CTGATGTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGATGTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R095-ACTGTCGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACTGTCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R096-GATGGTCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATGGTCAGTCTCGTGGGCTCGG
I	R097-GTTGTTCC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTTGTTCCGTCTCGTGGGCTCGG
	R098-TGTGACTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGTGACTCGTCTCGTGGGCTCGG
	R099-TGTCAAGC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGTCAAGCGTCTCGTGGGCTCGG
	R100-ACACTCGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACACTCGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R101-CAACTGAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAACTGAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R102-ACCTGATG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACCTGATGGTCTCGTGGGCTCGG
	R103-GAAGCAGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAAGCAGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R104-CTGTACCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGTACCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R105-AAGAGGAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGAGGAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R106-TACACGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACACGTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R107-TGACACAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGACACAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R108-AGTGCTAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGTGCTAGGTCTCGTGGGCTCGG
J	R109-TCCTGCAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCCTGCATGTCTCGTGGGCTCGG
	R110-TGAGAGAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGAGAGATGTCTCGTGGGCTCGG
	R111-CTAGTTCG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTAGTTCGGTCTCGTGGGCTCGG
	R112-GTCCTCAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTCCTCATGTCTCGTGGGCTCGG
	R113-GATGAAGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATGAAGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R114-ACAACCTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACAACCTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R115-ATGATCGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATGATCGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R116-TGTGATCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGTGATCAGTCTCGTGGGCTCGG
	R117-CTGTGTAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGTGTACGTCTCGTGGGCTCGG
	R118-TGCAAGGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGCAAGGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R119-AAGTCATC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGTCATCGTCTCGTGGGCTCGG
	R120-GCACTTGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCACTTGTGTCTCGTGGGCTCGG
K	R121-TCATGCTA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCATGCTAGTCTCGTGGGCTCGG
	R122-TAGAGTGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTAGAGTGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R123-ACACTGTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACACTGTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R124-AACCAGAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAACCAGAGGTCTCGTGGGCTCGG

次ページに続く

前ページからの続き

Set	Name	Sequence
	R125-GTTGCTGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTTGCTGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R126-CAACTACA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAACTACAGTCTCGTGGGCTCGG
	R127-TGTCAGTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGTCAGTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R128-AGTACCAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGTACCACGTCTCGTGGGCTCGG
	R129-GAAGTTGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAAGTTGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R130-ATGGTACC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATGGTACCGTCTCGTGGGCTCGG
	R131-TTGAGGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTGAGGTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R132-CTCTACAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTCTACACGTCTCGTGGGCTCGG
L	R133-CTTGAGCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTTGAGCAGTCTCGTGGGCTCGG
	R134-CTGTTGGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGTTGGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R135-ACAAGTGC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACAAGTGCGTCTCGTGGGCTCGG
	R136-GGTACCTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGTACCTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R137-GATCTAGC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATCTAGCGTCTCGTGGGCTCGG
	R138-ATCTGTTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCTGTTCGTCTCGTGGGCTCGG
	R139-TAGTCCAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTAGTCCAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R140-TACCATGC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACCATGCGTCTCGTGGGCTCGG
	R141-AGGTTGAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGGTTGAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R142-GTGACTCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGACTCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R143-TCAGTACG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCAGTACGGTCTCGTGGGCTCGG
	R144-TACAGATG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACAGATGGTCTCGTGGGCTCGG
M	R145-TCTGAAGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTGAAGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R146-ATGTGACA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATGTGACAGTCTCGTGGGCTCGG
	R147-CCTACAAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCCTACAAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R148-GTTCTCGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTTCTCGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R149-ATCGTCTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCGTCTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R150-AAGACGTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGACGTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R151-GCATCGAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCATCGATGTCTCGTGGGCTCGG
	R152-ACTCATCC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACTCATCCGTCTCGTGGGCTCGG
	R153-GGATGAAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGATGAACGTCTCGTGGGCTCGG
	R154-TGCATGTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGCATGTCTCGTGGGCTCGG
	R155-CGAAGTGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGAAGTGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R156-TACTCTGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACTCTGTGTCTCGTGGGCTCGG
N	R157-AGAACAGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGAACAGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R158-AGTCCAGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGTCCAGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R159-CTCCAGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTCCAGTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R160-GACGTCAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGACGTCAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R161-TCATCTCC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCATCTCCGTCTCGTGGGCTCGG
	R162-TGCTTCAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGCTTCAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R163-ACAAGGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACAAGGTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R164-CTACGTCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTACGTCAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R165-ACTCTACT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACTCTACTGTCTCGTGGGCTCGG
	R166-CACTAGTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCACTAGTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R167-TTGGTGTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTGGTGTCGTCTCGTGGGCTCGG
	R168-GAGAGAAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAGAGAAGGTCTCGTGGGCTCGG
O	R169-CTTCGTGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTTCGTGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R170-TGACTAGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGACTAGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R171-GTGAAGTA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGAAGTAGTCTCGTGGGCTCGG
	R172-TGCAGCTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGCAGCTTGTCTCGTGGGCTCGG

次ページに続く

前ページからの続き

Set	Name	Sequence
	R173-TTGTCGAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTGTCGATGTCTCGTGGGCTCGG
	R174-CTAGGTTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTAGGTTTCGTCTCGTGGGCTCGG
	R175-ACATCACT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCACTGTCTCGTGGGCTCGG
	R176-AACGTGAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAACGTGACGTCTCGTGGGCTCGG
	R177-GCTACCAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCTACCAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R178-TCACATCG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCACATCGGTCTCGTGGGCTCGG
	R179-AACGACTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAACGACTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R180-ACTGGAAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACTGGAACGTCTCGTGGGCTCGG
P	R181-GAACGAGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAACGAGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R182-AGACCTTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGACCTTCGTCTCGTGGGCTCGG
	R183-AACCTGCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAACCTGCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R184-CATGGTTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATGGTTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R185-TTCGTCAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTTCGTCAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R186-TGTCCACA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGTCCACAGTCTCGTGGGCTCGG
	R187-TGAGGTGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGAGGTGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R188-CTGTAGTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGTAGTCGTCTCGTGGGCTCGG
	R189-GAGAACGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAGAACGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R190-GTCACAGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTCACAGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R191-TCGTAGTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCGTAGTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R192-ACCAGTAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACCAGTAGGTCTCGTGGGCTCGG
Q	R193-TCTCAGCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTCAGCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R194-GGAAGGAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAAGGAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R195-ACACGTCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACACGTCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R196-ATCAAGTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCAAGTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R197-AGAGTCTA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGAGTCTAGTCTCGTGGGCTCGG
	R198-TCTTGACC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTTGACCGTCTCGTGGGCTCGG
	R199-GTACAAGC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTACAAGCGTCTCGTGGGCTCGG
	R200-ACTCGTGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACTCGTGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R201-TAGGTGAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTAGGTGATGTCTCGTGGGCTCGG
	R202-CACTCCAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCACTCCAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R203-TGGTCTTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGGTCTTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R204-CAGACAGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAGACAGTGTCTCGTGGGCTCGG
R	R205-AAGACCAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGACCATGTCTCGTGGGCTCGG
	R206-GTCAACAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTCAACAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R207-AACCTAGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAACCTAGGGTCTCGTGGGCTCGG
	R208-CAACCATG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAACCATGGTCTCGTGGGCTCGG
	R209-GTCACTTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTCACTTCGTCTCGTGGGCTCGG
	R210-CTAGGAGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTAGGAGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R211-AGGTGCAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGGTGCATGTCTCGTGGGCTCGG
	R212-TCTCTGTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R213-GGTTGAGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGTTGAGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R214-TCTGCTCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTGCTCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R215-CACTGTCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCACTGTCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R216-CCACAGTA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCCACAGTAGTCTCGTGGGCTCGG
S	R217-GACTGCTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGACTGCTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R218-GTGCTACA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGCTACAGTCTCGTGGGCTCGG
	R219-GTACACAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTACACAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R220-TGAGAAGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGAGAAGGGTCTCGTGGGCTCGG

次ページに続く

前ページからの続き

Set	Name	Sequence
	R221-ACCTCTAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACCTCTACGTCTCGTGGGCTCGG
	R222-ACAAGACG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACAAGACGGTCTCGTGGGCTCGG
	R223-TAGAAGTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTAGAAGTCGTCTCGTGGGCTCGG
	R224-AGCTGGAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCTGGAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R225-CATGGACT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATGGACTGTCTCGTGGGCTCGG
	R226-ACGTACGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGTACGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R227-TGAGTCCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGAGTCCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R228-CATCCTTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATCCTTCGTCTCGTGGGCTCGG
T	R229-TTGCTTGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTGCTTGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R230-CGATGTAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGATGTAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R231-GAACCTCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAACCTCAGTCTCGTGGGCTCGG
	R232-AACGTACA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAACGTACAGTCTCGTGGGCTCGG
	R233-GGACAGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGACAGTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R234-CGATCAGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGATCAGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R235-AGCTCCTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCTCCTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R236-ACGTCAAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGTCAAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R237-GCTAGTAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCTAGTACGTCTCGTGGGCTCGG
	R238-TTCGAGAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTTCGAGAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R239-ACTAGCTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACTAGCTCGTCTCGTGGGCTCGG
	R240-GAGCTGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAGCTGTTGTCTCGTGGGCTCGG
U	R241-ACTACTGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACTACTGGGTCTCGTGGGCTCGG
	R242-CTGTTTAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGTTTACAGTCTCGTGGGCTCGG
	R243-CGAACTCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGAACTCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R244-TCAAGGAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCAAGGAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R245-GATGGATC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATGGATCGTCTCGTGGGCTCGG
	R246-TCTGTCAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTGTCAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R247-TTCCAACA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCCAACAGTCTCGTGGGCTCGG
	R248-TGAGTGTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGAGTGTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R249-CTACTAGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTACTAGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R250-CTGGACTA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGGACTAGTCTCGTGGGCTCGG
	R251-GACAGGAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGACAGGATGTCTCGTGGGCTCGG
	R252-ACCTAGTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACCTAGTCGTCTCGTGGGCTCGG
V	R253-TGGACGAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGGACGAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R254-TAGCTACC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTAGCTACCGTCTCGTGGGCTCGG
	R255-GTTCTGTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTTCTGTGGTCTCGTGGGCTCGG
	R256-ACTTCAGC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACTTCAGCGTCTCGTGGGCTCGG
	R257-GTCAGTCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTCAGTCAGTCTCGTGGGCTCGG
	R258-GTCTCGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTCTCGTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R259-AGAGCATG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGAGCATGGTCTCGTGGGCTCGG
	R260-TCCAAGAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCCAAGACGTCTCGTGGGCTCGG
	R261-CAAGTCAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAAGTCATGTCTCGTGGGCTCGG
	R262-CCTAGCAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCCTAGCATGTCTCGTGGGCTCGG
	R263-AGTGTTCG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGTGTTCGCTCTCGTGGGCTCGG
	R264-AAGGAACG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGGAACGGTCTCGTGGGCTCGG
W	R265-TCACGAGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCACGAGTGTCTCGTGGGCTCGG
	R266-CTTCACAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTTCACATGTCTCGTGGGCTCGG
	R267-GACATGTA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGACATGTAGTCTCGTGGGCTCGG
	R268-TCCAGTCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCCAGTCTGTCTCGTGGGCTCGG

次ページに続く

前ページからの続き

Set	Name	Sequence
	R269-TACGAGCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACGAGCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R270-ATGGAAGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATGGAAGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R271-AAGCTTGC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGCTTGCGTCTCGTGGGCTCGG
	R272-CTCTCTAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTCTCTAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R273-TGATCAAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGATCAAGGTCTCGTGGGCTCGG
	R274-GATCACCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATCACCAGTCTCGTGGGCTCGG
	R275-CGTAGCTA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTAGCTAGTCTCGTGGGCTCGG
	R276-AGTTCTCC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGTTCTCCGTCTCGTGGGCTCGG
X	R277-CCTGATGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCCTGATGAGTCTCGTGGGCTCGG
	R278-GCTCTCTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCTCTCTTGTCTCGTGGGCTCGG
	R279-TGTTGGAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGTTGGACGTCTCGTGGGCTCGG
	R280-TCAACGTC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCAACGTCGTCTCGTGGGCTCGG
	R281-TACCACAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACCACATGTCTCGTGGGCTCGG
	R282-AAGACACA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGACACAGTCTCGTGGGCTCGG
	R283-ACATGGAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATGGACGTCTCGTGGGCTCGG
	R284-ATCAGAGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCAGAGGGTCTCGTGGGCTCGG
	R285-GTGGTGAA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGGTGAAGTCTCGTGGGCTCGG
	R286-CTCGATCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTCGATCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R287-GTTCATCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTTTCATCTGTCTCGTGGGCTCGG
	R288-AGGAGATG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGGAGATGGTCTCGTGGGCTCGG