



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 6 月 22 日

目次

はじめに	1
第 1 章 環境 DNA・メタゲノム DNA の採集方法	3
1.1 サンプルングデザイン	3
1.2 テクニカルレプリケートとネガティブコントロール	4
1.3 水からの濾過採集方法	4
1.3.1 濾過フィルターと濾過方法と固定方法の選定	4
1.3.2 濾過関連機材の塩素漂白の方法	4
必要な機材	4
必要な消耗品	4
作業手順	5
1.3.3 吸引濾過装置を用いた水からの微生物メタゲノム DNA・環境 DNA の濾過採集方法	5
必要な機材	5
必要な消耗品	6
作業手順	6
1.3.4 シリンジを用いた水からのメタゲノム DNA・環境 DNA の濾過採集方法	7
必要な機材	7
必要な消耗品	8
作業手順	8
第 2 章 DNA 抽出・ライブラリ調製・シーケンシング	11
2.1 機材・試薬の滅菌と DNA 分解によるコンタミネーションの防止	11
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	11
2.3 DNA 抽出	11
2.3.1 47mm グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出プロトコル	11
必要な機材	11
必要な試薬・消耗品	11
作業手順	11
2.3.2 47mm 非グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出プロトコル	11
必要な機材	11
必要な試薬・消耗品	12
作業手順	12
2.3.3 ステリベクスからの DNA 抽出プロトコル	12
必要な機材	12

	必要な試薬・消耗品	12
	作業手順	12
2.3.4	磁気ビーズを用いた DNA の精製プロトコル	12
	必要な機材	12
	必要な試薬・消耗品	12
	作業手順	12
2.4	ライブラリ調製	13
	必要な機材	13
	必要な試薬・消耗品	13
	作業手順	13
2.4.1	プライマーの設計と発注の方法	13
	必要な機材	13
	必要な試薬・消耗品	13
	作業手順	13
2.4.2	ユニバーサルプライマーを用いた PCR のプロトコル (泳動用)	13
	必要な機材	13
	必要な試薬・消耗品	14
	作業手順	14
2.4.3	アガロースゲル電気泳動のプロトコル	14
	必要な機材	14
	必要な試薬・消耗品	14
	作業手順	14
2.4.4	ユニバーサルプライマーを用いた PCR のプロトコル (本番用)	14
	必要な機材	14
	必要な試薬・消耗品	14
	作業手順	14
2.4.5	磁気ビーズを用いた PCR 産物の精製プロトコル	15
	必要な機材	15
	必要な試薬・消耗品	15
	作業手順	15
2.4.6	Exonuclease I を用いた PCR 産物の精製プロトコル	15
	必要な機材	15
	必要な試薬・消耗品	15
	作業手順	15
2.4.7	アダプターを付加する PCR のプロトコル	15
	必要な機材	15
	必要な試薬・消耗品	16
	作業手順	16
2.4.8	インデックスと P5・P7 アダプターを付加する PCR のプロトコル	16
	必要な機材	16
	必要な試薬・消耗品	16
	作業手順	16

2.4.9	磁気ビーズを用いた PCR 産物の濃度均一化	16
	必要な機材	16
	必要な試薬・消耗品	16
	作業手順	16
2.4.10	E-Gel SizeSelect によるサイズ選択	17
	必要な機材	17
	必要な試薬・消耗品	17
	作業手順	17
2.5	ライブラリのクオリティチェック	17
2.5.1	Qubit による濃度測定と希釈	17
	必要な機材	17
	必要な試薬・消耗品	17
	作業手順	17
2.5.2	Bioanalyzer による電気泳動	17
	必要な機材	17
	必要な試薬・消耗品	18
	作業手順	18
2.6	MiSeq によるシーケンス	18
	必要な機材	18
	必要な試薬・消耗品	18
	作業手順	18
引用文献		19
付録 A	DNA 採集関連機材の自作	21
A.1	漂白剤抜き器の作成	21
	必要な機材	21
	必要な部材	21
	作業手順	21
A.2	車載用吸引ポンプユニットの作成	21
	必要な機材	21
	必要な部材	21
	作業手順	22
A.3	吸引濾過装置の作成	22
	必要な機材	22
	必要な部材	22
	作業手順	22
付録 B	試薬の調製	23
B.1	DNA・RNA 固定液の調製	23
	必要な機材	23
	必要な試薬・消耗品	23
	作業手順	23

B.2	DNA 抽出用試薬の調製	23
B.2.1	Insect Lysis Buffer	23
	必要な機材	23
	必要な試薬・消耗品	23
	作業手順	24
B.2.2	Column Binding Buffer	24
	必要な機材	24
	必要な試薬・消耗品	24
	作業手順	24
B.2.3	Wash Buffer	24
	必要な機材	24
	必要な試薬・消耗品	24
	作業手順	24
B.3	PCR 産物精製用磁気ビーズ液の調製	25
	必要な機材	25
	必要な試薬・消耗品	25
	作業手順	25
B.4	PCR 産物濃度均一化用磁気ビーズ液の調製	25
	必要な機材	25
	必要な試薬・消耗品	25
	作業手順	25

はじめに

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

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

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

本書が皆さんの役に立つことができましたら幸いです。この機会を与えて下さった京大生態学研究センターの東樹宏和博士、水産研究・教育機構中央水産研究所の長井敏博士、龍谷大学の山中裕樹博士と、本書をお読みの皆さんに感謝します。

第 1 章

環境 DNA ・ メタゲノム DNA の採集方法

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

1.1 サンプルングデザイン

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

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

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

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

1.2 テクニカルレプリケートとネガティブコントロール

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

1.3.2 濾過関連機材の塩素漂白の方法

必要な機材

- 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タッパーやビーカー 1 個
- 防水作業着 1 着

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
- 使い捨てゴム手袋 1 双
- SPW 適量

作業手順

1. 漂白対象物が入る大きさのタッパーやビーカー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、同サイズのタッパーやビーカー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タッパーやビーカーを使用する)
5. 時々ゆすりながら 30 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タッパーやビーカーに漂白対象物に移す
11. SPW を漂白対象物が浸かるように注いですすいで捨てる
12. 乾燥が必要な場合はアルミホイルに包んで常温~60℃で乾燥する (60℃にする前に一度 200℃以上で庫内を滅菌してから 60℃に下げること)

なお、漂白剤抜き器を漂白対象物が入る大きさのタッパーとして使用しても問題ありません。また、漂白対象物が小さい場合、全ての作業をタッパーやビーカー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。

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

必要な機材

- 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こと) 1 個
- アズワン シリコンチューブ 内径 5mm 外径 6mm 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 6mm 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 × 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 0.45μm PVDF SVHV010RS
 - Millipore Sterivex-GV 0.22μm PVDF SVGV010RS
 - Millipore Sterivex-GP 0.22μm 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??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ピーカー 1 個/1 サンプル
 - 大塚刷毛製造 補修用カップ 容器のみ 400mL 3221110400
 - 大塚刷毛製造 補修用カップ 容器のみ 600mL 3221110600
 - 大塚刷毛製造 補修用カップ 容器のみ 800mL 3221110800
 - ビッグ 調色ミキシングカップ 1000mL MK11L
- セイニチ ユニパック C-4 1 枚/1 サンプル
- 使い捨てポリ手袋 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. 使い捨てピ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二つ折りにして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
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 RNAlater 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。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。

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

必要な機材

- タジマ コンボイ VS CNV-VS
- 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 × 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

- テルモ テルモシリンジ ロック付 50mL SS-50LZ 1 本/1 サンプル
- 大阪魂 丸ワッシャー 特寸 鉄/生地 M17 × 外径 50mm × 厚さ 3.2mm 1 枚/1 サンプル (乾熱滅菌で再利用可)
- 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. 使い捨てビーカーで必要量の水試料を量り取る
3. シリンジにビーカーから水試料 50mL を吸い取る (水に浸かるシリンジ先端 3cm 程度は触れないようにする)
4. 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
5. 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
6. コーキングガンの引き金を引いて加圧濾過する
7. シリンジ + Sterivex をコーキングガンから外す
8. Sterivex とシリンジを分離する
9. 必要量に達するまで 3 に戻って繰り返す
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. シリンジ + Sterivex をコーキングガンから外す
15. Sterivex とシリンジを分離する
16. 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
17. ポリ手袋を外して捨てる

ここでは Sterivex をすぐに冷凍する方法を示しましたが、中に RNAlater 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。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防止

2.2 テクニカルレプリケートとネガティブコントロール

2.3 DNA 抽出

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

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

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

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.3.3 ステリベクスからの DNA 抽出プロトコル

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.3.4 磁気ビーズを用いた DNA の精製プロトコル

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4 ライブラリ調製

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.1 プライマーの設計と発注の方法

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

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

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.3 アガロースゲル電気泳動のプロトコル

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

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

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.5 磁気ビーズを用いた PCR 産物の精製プロトコル

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

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

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.7 アダプターを付加する PCR のプロトコル

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

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

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.9 磁気ビーズを用いた PCR 産物の濃度均一化

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.4.10 E-Gel SizeSelect によるサイズ選択

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.5 ライブラリのクオリティチェック

2.5.1 Qubit による濃度測定と希釈

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.5.2 Bioanalyzer による電気泳動

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

2.6 MiSeq によるシーケンス

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

引用文献

付録 A

DNA 採集関連機材の自作

A.1 漂白剤抜き器の作成

必要な機材

-

必要な部材

-

作業手順

- 1.

A.2 車載用吸引ポンプユニットの作成

必要な機材

-

必要な部材

-

作業手順

- 1.

A.3 吸引濾過装置の作成

必要な機材

-

必要な部材

-

作業手順

- 1.

付録 B

試薬の調製

B.1 DNA・RNA 固定液の調製

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

B.2 DNA 抽出用試薬の調製

B.2.1 Insect Lysis Buffer

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

B.2.2 Column Binding Buffer

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

B.2.3 Wash Buffer

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

B.3 PCR 産物精製用磁気ビーズ液の調製

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.

B.4 PCR 産物濃度均一化用磁気ビーズ液の調製

必要な機材

-

必要な試薬・消耗品

-

作業手順

- 1.